



**Università degli Studi dell'Insubria**

*Corso di Dottorato di Ricerca – XXIII Ciclo*

**Tesi di Dottorato di Ricerca in**

**Scienze Ambientali**

“Analisi critica dei risultati del progetto PM-CARE: valutazione statistica dell’associazione tra esposizione al particolato urbano e parametri clinici di interesse”.

**Dottoranda:** Dott.sa Patrizia Urso

**Tutor:** Prof. Domenico M. Cavallo

**Co-Tutor:** Prof. Paolo Carrer



## Indice

SUMMARY	5
INTRODUZIONE	9
CAPITOLO 1. IL PARTICOLATO ATMOSFERICO	
1.1 Generalità sul particolato atmosferico	10
1.1.1 Classificazione del particolato	13
1.1.2 Sorgenti e meccanismi di formazione del particolato	17
1.1.3 Effetti sulla salute del Particolato Atmosferico	20
1.1.3.1 Evidenza epidemiologiche nell'incremento della mortalità	20
1.1.3.2 Effetti clinici	21
1.1.3.3 Meccanismi fisiopatologici	21
1.1.4 Legislazione	23
1.2 Il progetto PM-CARE	25
1.3 Il progetto di dottorato	28
1.3.1 Parametri ematochimici	29
1.3.1.1 Indicatori dell'infiammazione sistemica	29
1.3.1.2 Indicatori della coagulazione sanguigna	29
1.3.2 Parametri cardiologici	29
CAPITOLO 2. MATERIALI E METODI	
2.1 Indagine ambientale	31
2.1.1 Strumentazione	32
2.1.1.1 Misure di concentrazione gravimetrica di particolato	32
2.1.1.2 Misure di concentrazione numerica di particolato	33
2.1.1.3 Misura dei conquinanti e dei parametri microclimatici	35
2.1.2 Unità mobile di monitoraggio	35
2.1.3 Protocollo di indagine ambientale	37
2.2 Indagine clinica	37
2.2.1 Selezione del campione	37
2.2.2 Protocollo di indagine clinica	38
2.3 Trattamento statistico	39
2.3.1 Analisi descrittiva	39
2.3.2 Analisi dei dati discreti	40

2.3.3 Analisi dei dati in continuo	42
2.3.3.1 <i>Approccio grafico</i>	42
2.3.3.2 <i>Studio della correlazione</i>	43
 CAPITOLO 3. RISULTATI E DISCUSSIONE	
3.1 Analisi dei livelli di particolato ambientale del progetto PM-CARE	44
3.1.1 Variazione tra l'esposizione nella stagione calda e nella stagione fredda	44
3.1.2 Variazione dell'esposizione tra il giorno e la notte	46
3.1.3 Variazione dell'esposizione tra i gruppi di soggetti	48
3.1.4 Discussioni dei risultati ambientali	49
3.2 Descrizione della popolazione studiata	50
3.3 Analisi degli indici di infiammazione e coagulazione	51
3.3.1 Studio dell'associazione tra particolato atmosferico e indici dell'infiammazione e della coagulazione	52
3.3.2 Discussione dei risultati per gli indicatori di infiammazione e coagulazione	56
3.4 Analisi degli indici della variabilità cardiaca	57
3.4.1 Studio dell'associazione tra particolato atmosferico e indici della variabilità cardiaca	58
3.4.2 Analisi dei dati continui	64
3.4.2.1 <i>Approccio grafico</i>	65
3.4.2.2 <i>Studio della correlazione</i>	66
3.4.3 Discussione dei risultati per gli indicatori della variabilità della frequenza cardiaca	67
 CAPITOLO 4. CONCLUSIONI	69
 BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO	72

## SUMMARY

Lo studio degli effetti sulla salute umana legati all'esposizione a particolato atmosferico sono ormai noti, ma è ancora necessario indagare i meccanismi patogenetici che li determinano. Il presente progetto di dottorato, che si inserisce nel contesto di un progetto di rilevanza nazionale, il progetto PM-CARE, ha l'obiettivo di studiare l'associazione tra esposizione a particolato e l'andamento di una selezione di parametri clinici di interesse.

Il progetto è stato sviluppato mediante l'effettuazione di due monitoraggi, di 24 ore ciascuno, uno nel periodo invernale e l'altro nel periodo estivo, nell'ipotesi di concentrazioni di particolato differenti. La popolazione studiata è stata costituita da 81 volontari, residenti nelle province di Milano e Monza, suddivisi in 3 gruppi: cardiopatici, pneumopatici e "non cardiopatici-non pneumopatici", (cosiddetti "sani"), per indagare una diversa suscettibilità al particolato.

Le misure di esposizione sono state di tipo individuale, realizzate mediante un prototipo di unità mobile di monitoraggio (M.M.U.), una valigia con rotelle contenente tutti gli strumenti di misura necessari al monitoraggio e facilmente trasportabile dai soggetti. Si è ottenuta, quindi, una stima realistica dell'esposizione relativa a diverse frazioni di particolato, identificate dal diametro aerodinamico delle particelle [ $d_a$ ], in termini di concentrazioni gravimetriche (suddivise nelle frazioni con  $d_a$  massimi: 0.5, 1, 2.5 e 10  $\mu\text{m}$ ), e di concentrazioni numeriche, (range  $d_a > 0.02 \mu\text{m}$ ). Sono stati misurati, inoltre, parametri coinquinanti ( $\text{O}_3$ , CO,  $\text{NO}_2$ ) e a parametri microclimatici (T, rH). A completamento dello scenario espositivo, è stata compilata una check-list contenente le principali informazioni sulle caratteristiche degli ambienti di vita dei soggetti, oltre ad un diario delle attività da essi svolte durante i monitoraggi.

Le misure di tipo clinico, contestuali a quelle ambientali, hanno previsto esami di tipo ematochimico, cardiologico e respiratorio.

L'obiettivo del progetto di dottorato è stato quello di studiare l'associazione tra l'esposizione a particolato atmosferico e l'andamento di parametri clinici di interesse, selezionati in collaborazione con il team clinico del progetto. Dopo una prima analisi descrittiva, tali associazioni sono state verificate mediante l'applicazione dei modelli lineari misti per misure ripetute. A completamento dello studio, sono stati valutati, con un'analisi preliminare, i tempi di latenza tra esposizione ed effetto clinico, per i parametri cardiologici continui.

I parametri clinici scelti sono stati la proteina C-reattiva (hs-PCR), il fibrinogeno e due indici della variabilità cardiaca: la frequenza cardiaca (FC) e la deviazione standard dell'intervallo tra due battiti normali N-N (SDNN).

La hs.PCR è uno dei principali indici di infiammazione sistemica ed è associata al rischio di eventi coronarici acuti. Il fibrinogeno è un indicatore dello stato coagulatorio del sangue e il suo incremento è associato a una maggior predisposizione alla formazione di trombi ed eventi coagulatori che possono favorire la sindrome coronaria e l'infarto del miocardio. Entrambi i parametri sono stati derivati da un prelievo sanguigno a fine monitoraggio.

Alterazioni dei parametri cardiologici selezionati risultano associate a una riduzione della variabilità della frequenza cardiaca, a cui si deve un aumento nel rischio di mortalità per cause cardiovascolari, inclusa la morte cardiaca improvvisa. Entrambi i parametri sono stati derivati dal tracciato in continuo dell'elettrocardiogramma di tipo Holter, sulle 24 ore di monitoraggio.

I livelli di particolato sono risultati in media superiori ai livelli raccomandati dalle linee guida della WHO (rispettivamente di  $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$  e  $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) in entrambi i monitoraggi per il PM<sub>2.5</sub>, e nel monitoraggio invernale per il PM<sub>10</sub>.

Il PM<sub>10</sub>, costituito da tutte le particelle con diametro aerodinamico fino a  $10 \mu\text{m}$ , secondo le analisi eseguite, è risultato composto per circa il 67% dalle particelle con  $d_a < 0.5 \mu\text{m}$ , appartenenti alla moda di accumulazione.

Molto evidente, inoltre, è stato il trend stagionale, con livelli di esposizione più alti durante l'inverno. La variazione di concentrazione è stata sostanzialmente dovuta alla classe di particelle con diametro aerodinamico compreso tra  $0.3$  e  $1 \mu\text{m}$ , ( $\Delta\%: 141\%$  e per  $\text{PM}_{0.3-0.5 \mu\text{m}}$  e  $\Delta\%: 209\%$  per  $\text{PM}_{0.5-1 \mu\text{m}}$ ) dovuto soprattutto dalla presenza delle emissioni legate ai riscaldamenti domestici. È rimasta invece, sostanzialmente invariata la concentrazione delle particelle ultrafini, la cui presenza è fortemente legata alle sorgenti di combustione indoor e al traffico veicolare, indipendenti dal periodo dell'anno. Allo stesso modo anche la concentrazione di PM grossolano non ha subito grandi variazioni, probabilmente perché le sorgenti (polveri di provenienza naturale, pollini, spore, usura pneumatici etc.) non sono associate a fattori climatici.

Infine, sono stati riscontrati diversi livelli di esposizione fra i tre gruppi per la frazione  $0.3-1 \mu\text{m}$ , probabilmente a causa della maggior tendenza dei soggetti "sani" ad effettuare attività outdoor.

Lo studio dell'associazione a particolato per la proteina C-reattiva e per il fibrinogeno, hanno mostrato che esiste un effetto statisticamente significativo dovuto alla concentrazione numerica della frazione grossolana di particolato ( $5\div 10\text{ }\mu\text{m}$ ). Le sorgenti legate a questo tipo di esposizione sarebbero quindi di tipo prevalentemente outdoor. Endotossine batteriche, pollini e spore, caratteristici di questa frazione, potrebbero essere i responsabili dell'attivazione o incremento di uno stato di infiammazione sistemica e di processi coagulatori. Inoltre, le patologie caratterizzanti i tre gruppi di soggetti, non hanno influenzato la suscettibilità al particolato.

Gli indicatori della variabilità cardiaca sono risultati influenzati dalla concentrazione numerica di particelle con diametro aerodinamico compreso tra  $0.3$  e  $1\text{ }\mu\text{m}$ , e quindi dalla componente fine del particolato atmosferico. Questa frazione di particelle è legata a sorgenti sia indoor che outdoor e, considerato che la sua concentrazione è risultata predominante nel periodo invernale, l'esposizione della stagione fredda risulterebbe potenzialmente più nociva. Non si è riscontrata, inoltre, una diversa suscettibilità tra i gruppi di soggetti.

Dai risultati, un incremento delle concentrazioni di particolato determinerebbe un aumento della frequenza cardiaca, e una diminuzione di SDNN, traducibile, a livello clinico, in una diminuzione del controllo del sistema nervoso autonomo sulla regolazione del ritmo cardiaco e della funzionalità della bilancia simpato-vagale.

I meccanismi patogenetici compatibili con i risultati sono dunque legati all'infiammazione/ossidazione a livello polmonare, oppure ad un'azione diretta delle particelle sulle terminazioni nervose delle fibre afferenti polmonari, in accordo con la letteratura. La mancanza di un'associazione significativa con le particelle ultrafini escluderebbe l'ipotesi del passaggio diretto di questa frazione nella circolazione sanguigna.

Infine, lo studio preliminare sui tempi di latenza tra esposizione e frequenza cardiaca (per il gruppo 'non cardiopatici-non pneumopatici'), ha indicato un effetto di tipo immediato (dell'ordine dei  $5'$ - $30'$ ) e ritardato (circa  $6-8$  ore). I risultati, sebbene preliminari, trovano riscontro in quelli di altri gruppi di ricerca.

Per quanto riguarda il parametro SDNN, invece, il tipo di approccio statistico si è rivelato inadeguato alla tipologia di parametro.

Gli sviluppi futuri saranno quindi indirizzati all'approfondimento dei dati in continuo con un approccio statistico più raffinato (applicazione di modelli misti su moving averages a diversi intervalli temporali, utilizzo di smoothing functions).

Da un punto di vista prettamente ambientale, invece, si procederà con l'analisi delle concentrazioni di particolato in funzione di fattori determinanti, quali le attività dei soggetti durante il monitoraggio, le caratteristiche principali delle loro unità abitative e i livelli outdoor registrati dalla centraline ARPA più vicine.



# INTRODUZIONE

Gli effetti nocivi alla salute dell'uomo dovuti all'inquinamento atmosferico da particolato furono evidenti già dagli anni 50. Infatti, la catastrofe ambientale ricordata come "il Grande Smog", la coltre di nebbia densa che avvolse la città di Londra dal 5 al 9 dicembre del 1952, causò la morte di 12 000 persone e la malattia di altre 100 000 (*Berend 2006*). Da allora lo studio di questo tipo di inquinante ambientale ha impegnato la comunità scientifica, diventando argomento di grande attualità, in quanto associato alla salute della popolazione generale e alla vivibilità delle aree cittadine.

Nell'ultimo decennio sono stati pubblicati numerosi studi epidemiologici che evidenziano come le variazioni giornaliere della concentrazione del particolato nelle aree urbane siano associate ad una variazione giornaliera della morbosità e mortalità nella popolazione, dovute ad effetti lesivi a carico dell'apparato respiratorio e del sistema cardiocircolatorio.

Tuttavia, i meccanismi fisiopatologici alla base di tale associazione non sono ancora del tutto chiari e sono oggetto di particolare attenzione da parte della comunità scientifica internazionale.

Altro importante aspetto, che rimane oggetto di studio, riguarda l'individuazione delle sorgenti di particolato urbano maggiormente associate agli effetti nocivi sulla salute, al fine di orientare opportunamente le strategie di contenimento dell'esposizione.

In questo ambito di ricerca si inserisce il presente progetto di dottorato, che è parte di uno studio più ampio: il progetto di ricerca PM-CARE.

## ***CAPITOLO 1***

# **IL PARTICOLATO ATMOSFERICO**

### **1.1 Generalità sul particolato atmosferico**

Il particolato o PM (Particulate Matter) è un problema di inquinamento ambientale di grande attualità, non solo per le sue potenzialità nocive alla salute dell'uomo, ma anche perché esso è un inquinante ormai quasi ubiquitario che coinvolge la popolazione generale, in modo molto diverso in base alla tipologia dello scenario espositivo.

Il particolato è un insieme complesso di elementi eterogenei, con diversa origine, proprietà chimico-fisiche e caratteristiche morfologiche.

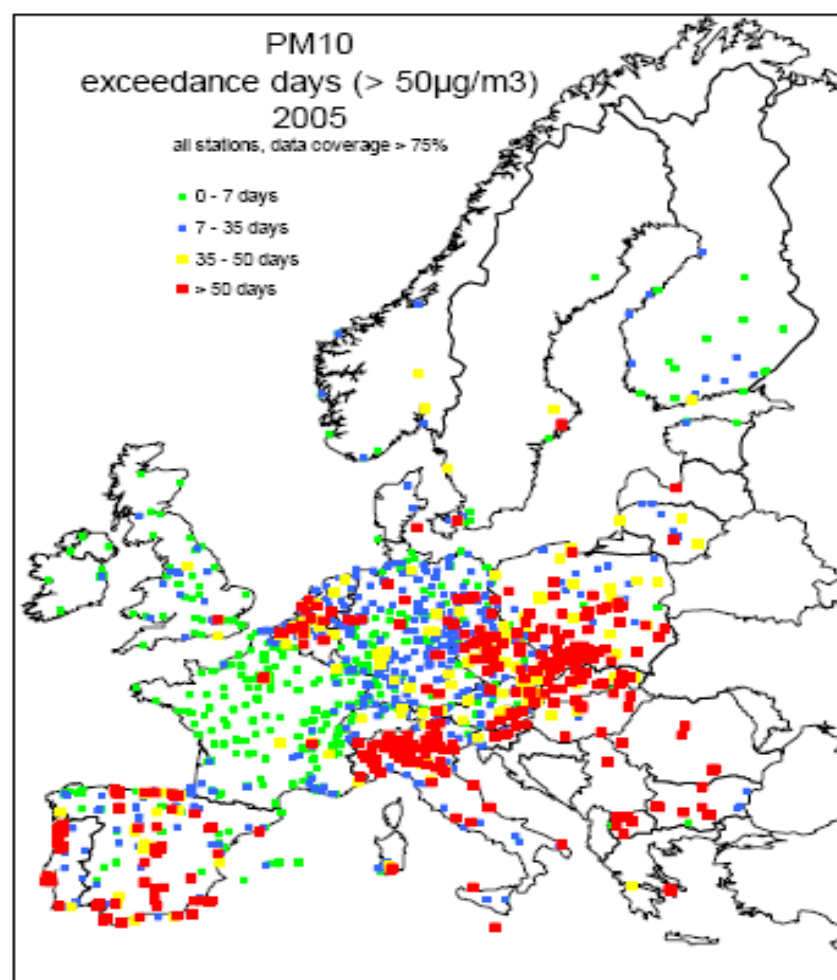
Le sorgenti di origine antropica sono molteplici. Rilevanti contributi ai livelli di esposizione sono sicuramente i processi di combustione e incenerimento di combustibili fossili, legno, rifiuti etc. Il traffico rappresenta anch'esso, sotto varie forme, un'importante causa di innalzamento dei livelli di particolato: basti pensare agli scarichi dei motori, all'usura meccanica di freni, frizioni, pneumatici dei mezzi e del manto stradale. Inoltre, molte attività produttive hanno come effetto indesiderato la produzione di materiale particellare: acciaierie, cementifici e molte altre categorie di industrie generano emissioni di particolato di diversa natura e quantità, in base alla tipologia di materiali e di lavorazione effettuata.

Non meno importanti sono le sorgenti naturali, il cui controllo è praticamente impossibile. Fra esse ricordiamo le eruzioni vulcaniche, l'effetto di erosione del vento

sulle aree rocciose o desertiche, gli incendi naturali, l'aerosol marino, i microrganismi, i pollini e le spore.

A questo quadro si aggiungono poi le cosiddette particelle secondarie, la cui importanza nella valutazione della qualità dell'aria è stata riconosciuta solo di recente. Esse si formano in atmosfera o dalla rottura di particelle grossolane, o a seguito di processi di condensazione di molecole di inquinanti in fase gassosa, che coagulano o si aggregano formando nuove particelle di dimensioni maggiori. Questo fenomeno avviene anche per effetto delle scariche elettriche durante i temporali e per la presenza di campi elettrici e magnetici nell'atmosfera, essendo il particolato costituito in generale da particelle elettrizzate.

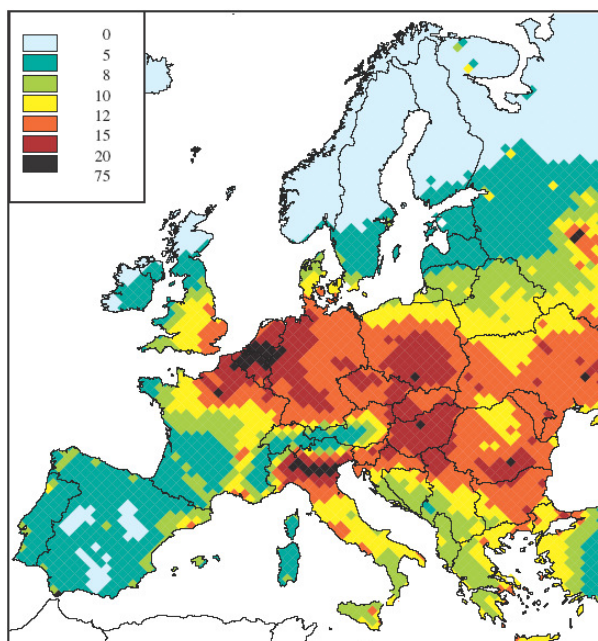
Nonostante la loro eterogeneità, la velocità di sedimentazione si mantiene sempre molto bassa. Questo comporta un lungo tempo di permanenza in atmosfera, dell'ordine di giorni, settimane o mesi, in modo fortemente legato a fattori quali le condizioni meteorologiche e alla conformazione geologica del territorio. Infatti, una zona geografica protetta dai venti, per la presenza di barriere naturali, sarà soggetta a un minor ricircolo d'aria, come avviene nelle zone situate a un livello inferiore a quello del mare o circondate da catene montuose. Per quanto riguarda la dipendenza climatica, le concentrazioni di particolato vicino al suolo dipendono fortemente dalle capacità di diluizione dell'atmosfera. Lo strato di rimescolamento, lo strato d'aria più vicino al suolo, dove avviene la diffusione degli inquinanti, ha un'altezza che varia di stagione in stagione ed è molto più alto in estate che in inverno. Per questo motivo nella stagione fredda gli inquinanti vengono meno diluiti e tendono a concentrarsi vicino al suolo.



**Fig. 1.1 Numero di giorni in cui è stato superato il valore limite nelle 24 ore di PM10 (50 µg/m³) nel 2005. (AIRBASE <http://airbase.eionet.europa.eu>)**

Dalla figura è possibile identificare nelle aree in cui i livelli di PM10 hanno superato i 50 µg/m³, l'importanza delle sorgenti antropiche individuando le zone ad alta urbanizzazione o le zone del nord-est europeo, note per l'utilizzo di combustibili fossili per il riscaldamento delle case. Allo stesso modo sono riconoscibili le zone più carenti di ricambio di aria per conformazione geologica, come ad esempio la zona depressa dei Paesi Bassi, la zona della pianura padana, protetta dai venti dalle catene montuose che la circondano.

La figura 2 mostra invece le ripercussioni sulla salute pubblica delle concentrazioni di particolato atmosferico in termini di livelli di mortalità prematura riconducibile all'esposizione al PM2.5 nell'anno 2000 ed è tratto dalla Valutazione di Impatto redatta dalla Commissione Europea (settembre 2005 – SEC2005 1133).



**Fig 1.2 Livelli di mortalità prematura (per 10 000 all'anno) dovuta all'esposizione a PM2.5 nell'anno 2000. (Valutazione di Impatto (09/2005 – SEC2005 1133), Commissione Europea)**

### 1.1.1 Classificazione del particolato

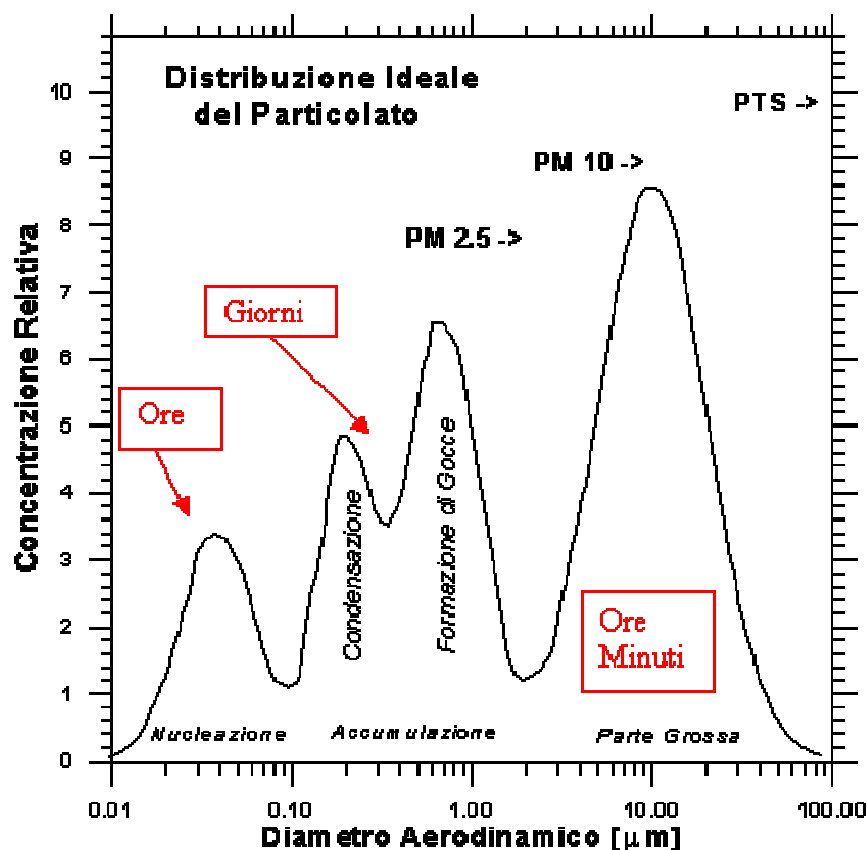
La necessità degli studiosi di suddividere l'insieme della materia particellare sospesa in aria in classi riconducibili a precise caratteristiche ha portato a diverse classificazioni. Ognuna di esse necessita di una grandezza in grado di rendere omogenee le particelle dal punto di vista del loro comportamento aerodinamico. Dato che la loro diversa natura le rende estremamente variegata in termini di geometrie e dimensioni, si è scelto di assimilare una particella "reale" a una particella "ideale", di forma sferica ma dal medesimo comportamento dinamico in aria. La grandezza che la caratterizza è quindi il suo diametro, chiamato "**diametro aerodinamico**". Questa grandezza viene convenzionalmente espressa in  $\mu\text{m}$  ed è quel numero che, unito all'acronimo PM (Particulate Matter), indica le dimensioni massime del particolato a cui si fa riferimento.

A causa della diversa origine delle particelle, la distribuzione dimensionale assume un andamento preciso, su cui si basa la classificazione "**Modale**", che tiene conto quindi sia della distribuzione delle dimensioni che dei meccanismi di formazione delle particelle [Whitby 1978].

In questo caso il particolato è suddiviso in tre grandi classi dimensionali:

- le particelle ultrafini (UFPs), che hanno diametro aerodinamico  $< 0.1 \mu\text{m}$  e possono appartenere alla moda di nucleazione ( $d_a < 0.01 \mu\text{m}$ ) o alla moda di Aitken ( $0.01 < d_a < 0.1 \mu\text{m}$ );
- le particelle fini (FP), che hanno diametro aerodinamico compreso tra  $0.1$  e  $2.5 \mu\text{m}$  e appartengono alla classe delle particelle della *moda di accumulazione*;
- le particelle grossolane (CP) che hanno diametro  $> 2.5 \mu\text{m}$  e costituiscono la classe delle particelle della moda grossolana.

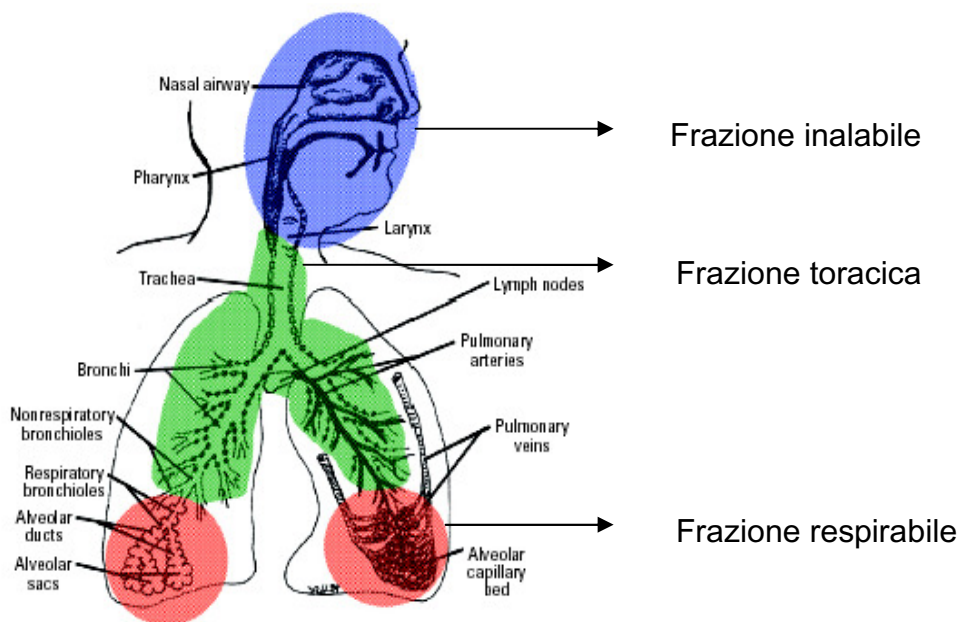
La figura 1.3 mostra la distribuzione teorica del particolato atmosferico, con i relativi processi di formazione, i tempi tipici di sospensione in atmosfera e le frazioni granulometriche comunemente individuate.



**Fig 1.3 Distribuzione dimensionale tipica delle particelle in atmosfera urbana.**

L'ambito della Medicina del Lavoro utilizza invece la classificazione *"Dosimetrica"*, che si basa sulla capacità delle particelle di penetrare nei diversi tratti dell'apparato respiratorio. Le frazioni sono suddivise in particelle inalabili ( $d_a < 100 \mu\text{m}$ ), che raggiungono la cavità orale e nasale durante l'atto inspiratorio; in particelle toraciche ( $d_a < 10 \mu\text{m}$ ), che superano la laringe e raggiungono i bronchi; infine in particelle

respirabili ( $d_a < 2.5 \mu m$ ), che sono in grado di raggiungere la zona polmonare più profonda, cioè gli alveoli (fig. 1.4).



**Fig 1.4 Schematizzazione della classificazione del particolato in termini di capacità di penetrazione all'interno del sistema respiratorio. (ICRP Model 1994; Nose-breathing)**

La classificazione per “**Tagli Dimensionali**” suddivide invece le particelle sulla base delle quantità di particolato che i diversi sistemi di campionamento sono in grado di rilevare in funzione del diametro aerodinamico. Ci si riferisce al campionamento di particelle con misura aerodinamica minore o compresa in un certo campo di valori, solitamente definito attraverso il 50% della misura del punto di taglio. Questa classificazione è nata nella speranza di misurare frazioni di particolato con caratteristiche significative sotto diversi punti di vista (salute, visibilità, ripartizione delle concentrazioni misurate, etc.). Essa viene adottata dagli enti preposti alla regolamentazione ambientale e per le misure di riferimento negli standard di qualità dell'aria.

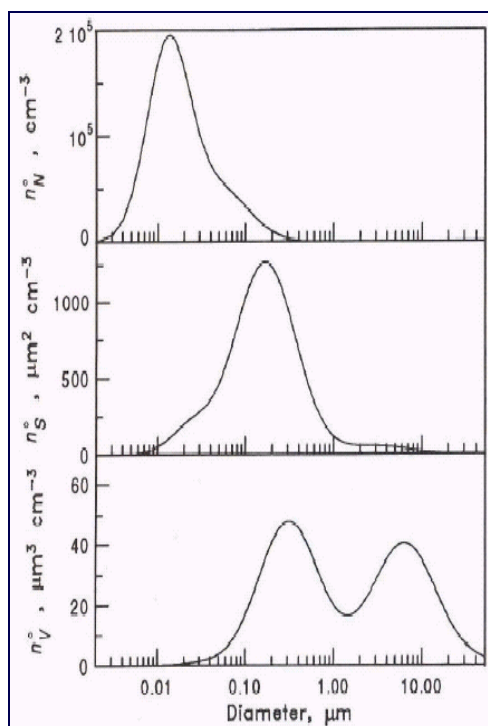
In questo modo si definisce:

**PTS** (particelle totali sospese) come quella classe di particelle di dimensioni tali da restare in sospensione per un tempo sufficiente ad essere campionate con un sistema di campionamento rispondente a specifiche caratteristiche geometriche in relazione a determinati flussi di prelievo. In pratica sono le particelle con diametro aerodinamico inferiore a  $100 \mu m$ .

**PM10** come la frazione di particolato raccolta da un sistema di campionamento secondo il quale le particelle con diametro aerodinamico uguale a 10  $\mu\text{m}$  sono campionate con efficienza del 50%.

**PM2.5** come la frazione di particolato raccolta da uno specifico sistema di campionamento tale per cui le particelle con diametro aerodinamico uguale a 2.5  $\mu\text{m}$  sono campionate con efficienza del 50%; esse rappresentano circa il 60% del PM10.

La suddivisione del particolato in classi dimensionali è molto importante nel momento in cui si voglia misurare la sua concentrazione in aria. Infatti la dimensione è un utile elemento per la scelta del parametro di cui si voglia misurare la concentrazione: se la massa, se la superficie o se la numerosità. Dal grafico riportato in fig. 1.5 è infatti molto evidente che le particelle ultrafini dominano completamente la distribuzione della concentrazione numerica, mentre le particelle fini portano il contributo più importante alla concentrazione della superficie particellare; infine, che le classi di dimensione intermedia e grossolana sono quelle con il maggior peso nella misura della concentrazione di massa, rimanendo trascurabile il contributo delle particelle più fini.



**Fig. 1.5** Tipica distribuzione del numero, della superficie e del volume del particolato urbano in funzione del diametro aerodinamico ("Atmospheric Physics and Chemistry", Seinfeld and Pandis, 1998)



### 1.1.2 Sorgenti e meccanismi di formazione del particolato

La presenza del particolato in atmosfera è legata a molteplici fenomeni, estremamente eterogenei e complessi. Il meccanismo di diffusione dell'inquinante del tipo 'sorgente primaria  $\Rightarrow$  concentrazione in atmosfera' da solo non è certamente rappresentativo dei processi di formazione del particolato aerodisperso ed è caratteristico delle sole sorgenti primarie, che introducono il particolato direttamente in atmosfera senza che esso sia soggetto a modifiche chimiche sostanziali.

Una grande componente del particolato, però, è il prodotto di fenomeni spesso non completamente noti, che hanno le loro origini nella chimica-fisica dell'atmosfera e che si sviluppano con processi di condensazione e nucleazione, conseguenti a reazioni chimiche di diverso tipo. È questo il cosiddetto particolato di origine secondaria, da una parte dovuto alla condensazione di molecole presenti in fase gassosa e alla loro successiva nucleazione e infine alla coagulazione fino a formare aerosol con diametri compresi tra 0.1  $\mu\text{m}$  e 1  $\mu\text{m}$ ; dall'altra parte alla notevole reattività chimica a partire dal particolato di origine primaria.

Altra categorizzazione importante è legata al contesto in cui si genera la sorgente: essa può essere prodotta dall'uomo oppure dalla natura stessa. Bisogna sottolineare inoltre che le sorgenti naturali danno origine solo al particolato di granulometria più grossolana mentre le sorgenti antropiche possono dare origine a particolato di tutte le granulometrie. Nella successiva tabella indichiamo le principali sorgenti di esposizione a particolato.

Sorgenti naturali	Sorgenti antropiche
Spray marino Erosione della crosta terrestre Incendi boschivi Eruzioni vulcaniche Risospensione di polvere dal suolo Pollini e spore Microrganismi Polvere cosmica	Emissioni di autoveicoli Usura di manto stradale, pneumatici e freni Uso di combustibili fossili Emissioni di riscaldamento domestico Cottura del cibo Combustione di biomasse Emissioni di particolari lavorazioni (es. metalli e materiali per l'edilizia) Lavorazioni agricole Inceneritori e centrali elettriche Fumo di tabacco, incenso e candele Incendi non naturali

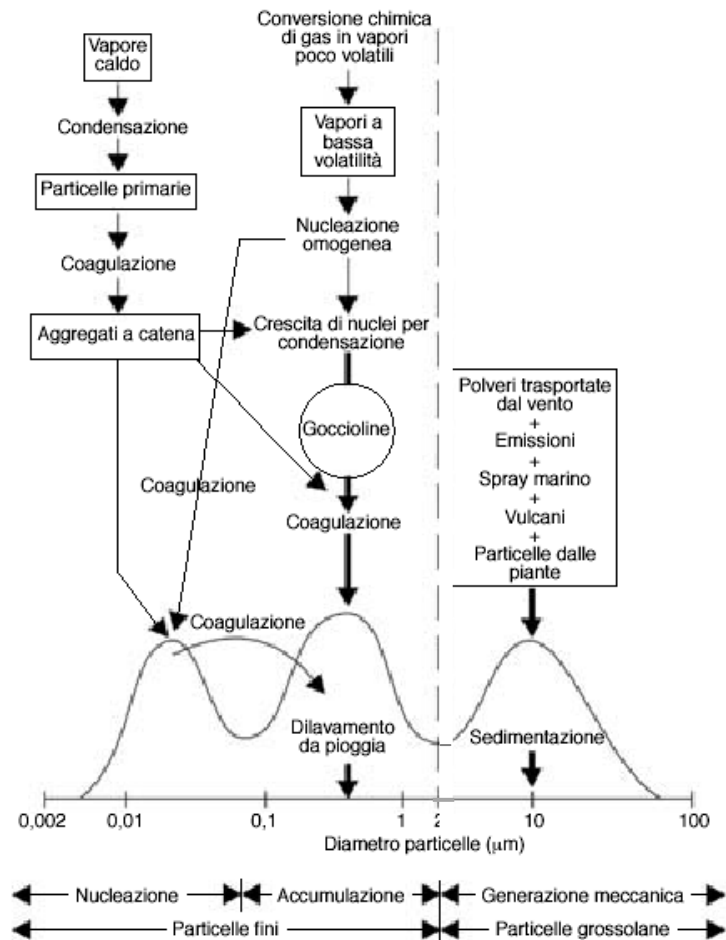
**Tab 1.1 Principali sorgenti di particolato atmosferico suddivise in base alla loro origine, se antropica o naturale.**

La dimensione delle particelle è un utile indicatore della loro provenienza. Infatti, la frazione con diametro aerodinamico compreso tra 1 e 10  $\mu\text{m}$  è prevalentemente costituita da materiali inerti derivanti dall'erosione o abrasione meccanica di materiali solidi di vario tipo così come da elementi biologici quali pollini, spore e batteri.

Le particelle appartenenti al range delle ultrafini, ovvero con diametro aerodinamico < 0.1  $\mu\text{m}$  sono particelle secondarie, che si formano in atmosfera da processi di condensazione o di foto-ossidazione da precursori gassosi (*Kreyling* 2003) quali il biossido di zolfo, ossidi di azoto, ammoniaca e composti organici volatili (VOCs), oppure dai processi di combustione (*Rohr* 2003). In particolare le particelle prodotte per combustione sono particelle carboniose di fuliggine, caratterizzate da una prevalenza di carbonio, per cui vengono classificate come "particolato carbonioso". Esse trattengono quasi sempre le sostanze tossiche prodotte al momento della combustione, quali composti organici volatili e diossine, rappresentando pertanto un potenziale nocivo per la salute. La loro presenza è molto accentuata nelle zone adiacenti alle strade trafficate, in modo fortemente dipendente dalla loro distanza, con una variabilità nella distribuzione spaziale maggiore rispetto alle classi di diametro aerodinamico superiore.

Il range intermedio, ovvero quello compreso tra 0.1 e 1  $\mu\text{m}$ , è costituito essenzialmente da polveri generate dall'aggregazione di goccioline di nitrati e solfati con dimensioni inferiori al micron, dalla coagulazione della fuliggine e dal particolato di dimensioni maggiori, originati dai processi di combustione (*See SW and Balasubramanian R* 2006). A questa classe dimensionale, infine, si aggiungono anche le particelle derivanti dalla disgregazione chimico fisica delle particelle grossolane.

Lo schema riportato di seguito (fig.1.6) descrive i processi di generazione del particolato in base al diametro aerodinamico.



**Fig 1.6 Schematizzazione dei processi di formazione di particolato atmosferico.**

Inoltre ci sono alcuni inquinanti, per i quali è stato accertato un effetto cancerogeno, su cui non è possibile stabilire dei valori al di sotto dei quali non vi siano rischi. Tra questi ci sono il benzene e gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA). Gli IPA sono composti organici contenenti due o più anelli aromatici che condividono una coppia di atomi di carbonio e ne sono stati individuati 16 come inquinanti prioritari. Questi composti hanno origine soprattutto dalle emissioni attribuibili al traffico pesante e l'80-90% è contenuto nella frazione di PM<sub>2.5</sub>. Sebbene costituiscano soltanto una frazione minima del particolato (inferiore a una parte su diecimila) rivestono una grande importanza a livello tossicologico.

### **1.1.3 Effetti sulla salute del Particolato Atmosferico**

#### ***1.1.3.1 Evidenze epidemiologiche nell'incremento della mortalità***

Vari studi epidemiologici condotti negli ultimi decenni hanno analizzato gli effetti sanitari, cronici e acuti, dell'inquinamento atmosferico da particolato.

##### *Esposizione cronica*

Nell'ambito degli studi sull'esposizione cronica, Dockery et al hanno analizzato la mortalità in sei città degli Stati Uniti, caratterizzata da diversi livelli di inquinamento atmosferico, trovando una correlazione tra i livelli di esposizione a particelle fini e la mortalità per cause cardiovascolari (*Dockery* 1993). Pope e il suo gruppo di ricerca, analizzando i dati di un importante studio di coorte della American Cancer Society (ACS study), ha trovato un'associazione significativa tra l'inquinamento da particolato atmosferico e la sopravvivenza (*Pope* 1999). Per ogni aumento di  $10\mu\text{g}/\text{m}^3$  nella concentrazione media annuale di PM<sub>2.5</sub> si osservava un incremento della mortalità generale (4%), soprattutto per patologie cardio-polmonari (6%). Un altro studio condotto negli Stati Uniti da Woodruff nel 1997 ha posto in evidenza una relazione tra l'esposizione a livelli di concentrazione di PM<sub>10</sub> compresi tra 40 e 50  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  nel primo anno di vita e un aumento della mortalità generale, di quella per sindrome della morte improvvisa del neonato (morte in culla) e di quella per patologie cardio-polmonari (*Woodruff* 1997). In alcuni studi, inoltre, l'esposizione cronica a particolato è stata associata ad un incremento di rischio cancerogeno specifico per le vie respiratorie (*Cohen and Pope* 1995; *Hext* 1994, *Dockery* 1993).

##### *Esposizione acuta*

I due più importanti studi epidemiologici sugli effetti acuti dell'esposizione a particolato sono il National Morbidity, Mortality and Air Pollution Study (NMMAPS) (*Samet* 2000) e il progetto Air Pollution and Health: a European Approach (APHEA-2) (*Katsouyanni* 2001). I risultati del NMMAPS, ottenuti studiando gli effetti su 50 milioni di persone in venti grandi città americane, mostrano un'associazione tra la percentuale media di mortalità e le concentrazioni di particolato del giorno precedente. In particolare, ad ogni aumento di  $10\mu\text{g}/\text{m}^3$  nei livelli di PM<sub>10</sub> si associava un aumento dello 0.21% ( $\pm 0.06$  ES) e 0.31% ( $\pm 0.09$  ES), rispettivamente, della mortalità generale e per cause cardio-respiratorie. Lo studio APHEA-2 ha dimostrato delle associazioni più forti tra l'inquinamento (misurato come media delle concentrazioni di particolato nel giorno stesso e nel giorno

precedente) e gli effetti avversi sulla salute. Per 43 milioni di persone in ventinove città europee, l'aumento stimato della mortalità giornaliera era 0.6% (IC 95% 0.4 – 0.8 %) per ogni aumento di 10µg/m<sup>3</sup> del PM10.

#### ***1.1.3.2 Effetti clinici***

I principali effetti acuti del particolato atmosferico a carico dell'*apparato respiratorio* comprendono l'esacerbazione di asma, di broncopatia cronica ostruttiva (BPCO) e l'insorgere di polmoniti, dimostrati in termini di aumento di accessi al pronto soccorso e di ricoveri ospedalieri per tali patologie (*Schwartz* 1994; *Schwartz* 1997). Prendendo in considerazione le singole cause di morte dovute a un effetto sul *sistema cardiovascolare*, il rischio relativo è risultato in genere maggiore per ischemia miocardica, e minore, seppur significativo, per aritmie, scompenso cardiocircolatorio e arresto cardiaco (*Dockery* 1993; *Goldberg* 2001; *Hoek* 2001; *Kwon* 2001; *Laden* 2000; *Pope* 2004; *Rossi* 1999; *Schwartz* 1996; *Wichmann* 2000; *Zanobetti* 2004). Lo studio di tali effetti è stato basato sull'associazione tra l'esposizione a particolato e i ricoveri per patologie cardiovascolari,

È da sottolineare, infine, che il particolato non è il solo inquinante dell'aria urbana responsabile degli effetti avversi sulla salute. Infatti, studi epidemiologici e clinici condotti negli ultimi dieci anni hanno evidenziato il ruolo di ulteriori inquinanti che svolgono la loro azione lesiva sia individualmente sia in combinazione: monossido di carbonio, biossido di azoto, ozono e i componenti organici del particolato, in particolare gli idrocarburi policiclici aromatici (*Poloniecki* 1997).

#### ***1.1.3.3 Meccanismi fisiopatologici***

I meccanismi attraverso i quali il particolato urbano induce un aggravamento non solo della patologia respiratoria ma anche di quella cardiocircolatoria, sembrano essere molteplici, complessi e concatenati, tanto che la comunità scientifica sia nazionale che internazionale è concorde nell'affermare che sono necessari ulteriori approfondimenti.

Essi non si innescherebbero in modo mutuamente esclusivo ma si sovrapporrebbero temporalmente, con possibili momenti diversi di attivazione. Quelli fino ad oggi ipotizzati sono: (m-1) l'attivazione del sistema nervoso autonomo (SNA) attraverso lo stimolo diretto delle fibre nervose afferenti al polmone e la conseguente

alterazione dell'equilibrio del sistema nervoso autonomo; (m-2) il rapido passaggio delle particelle ultrafini e dei costituenti solubili del PM nella circolazione polmonare per poi raggiungere la circolazione sistemica, inducendo stress ossidativo e pro-infiammatorio direttamente nel muscolo cardiaco e nel sistema vascolare; (m-3) il rilascio in circolo di fattori infiammatori pro-ossidativi e/o pro infiammatori (i.e. citochine e cellule immuno-mediate) che dal polmone raggiungerebbero la circolazione sistemica.

I primi meccanismi possono essere parzialmente (m-1), o interamente (m-2) attivati senza richiedere l'innescò di un processo di infiammazione polmonare, bensì attraverso la diretta interazione tra particolato e recettori polmonari, sangue e sistema cardiovascolare. Questi sarebbero responsabili degli effetti acuti (poche ore dall'esposizione) e subacuti (diverse ore o giorni dall'esposizione) del particolato sul sistema cardiovascolare.

Il terzo tipo di meccanismo (m-3) ha in comune la componente eziologica, legata allo stress ossidativo sul tessuto polmonare, indotto dall'inalazione del particolato.

In questo caso si stimolerebbe una reazione locale pro-infiammatoria con aumentata produzione di specie reattive di ossigeno (ROS) e di citochine nell'albero respiratorio fino agli alveoli. Il rilascio di tali fattori pro-infiammatori richiamerebbe nel polmone cellule bianche dal circolo, in particolare neutrofili, e innescerebbe una **reazione infiammatoria sistemica** con il coinvolgimento del midollo osseo ematopoietico e del fegato, i quali reagirebbero producendo, rispettivamente, macrofagi, piastrine, linfociti, granulociti e proteine di fase acuta [fibrinogeno, proteina C-reattiva e SAA (serum amyloid A)], (*Salvi* 1999, *Ghio* 2000a, *Ghio* 2000b, *Fujii* 2001, *van Eeden* 2001, *Suwa* 2002, *Becker* 2003, *Brown* 2004, *Gonzalez-Flecha* 2004, *Bai* 2007). Passo successivo allo stato infiammatorio è un importante incremento dei fattori della **coagulazione sanguigna** (fibrinogeno, viscosità del plasma, piastrine), dimostrato con forti evidenze da parecchi studi epidemiologici (*Peters* 1997, *Ghio* 2003, *Nemmar* et al 2003, *Gilmour* 2005, *Carlsten* 2007, *Ruckler* 2007). Ciò genererebbe uno stato di ipercoagulazione e la formazione di trombi, spiegando l'incremento di rischio di infarto del miocardio e di sindrome coronarica, la progressione dell'arteriosclerosi nonché i disturbi al controllo autonomo del cuore (con alterazione della frequenza cardiaca, della sua variabilità della frequenza e della contrattilità del cuore). Questo meccanismo sarebbe quindi responsabile degli

effetti tardivi, interpretati come conseguenza indiretta dell'infiammazione, dapprima polmonare e in seguito sistemica (*Brook* 2004).

I tempi necessari all'attivazione dei meccanismi fisiopatologici a seguito dell'esposizione a particolato sono ancora in fase di studio e la loro individuazione potrebbe fornire un valido strumento nella comprensione dei meccanismi stessi, caratterizzati da diversi tempi di attivazione. Studi su coorti di soggetti, sia giovani che in età avanzata, hanno valutato l'associazione tra i parametri della variabilità cardiaca e i valori di esposizione a particolato fine e ultrafine mediati su intervalli crescenti da 1 a 4 ore, identificando un'associazione significativa (*Gold* 2000, *Chuang* 2005, *Magari* 2001). Altri studi hanno testato e riscontrato tempi di latenza sia immediati che cumulativi sulle funzioni autonome del sistema cardiaco per particelle con diametro compreso tra 0.02 e 1 $\mu$ m per tempi che vanno da 5 minuti a 9 ore (*Chan* 2004; *Adar* 2007). La presenza di un effetto "very short term" o immediato suggerirebbe l'ipotesi di un passaggio diretto in circolo delle particelle più piccole, come verificato dall'importante studio di Nemmar nel 2004 in cui è stato verificato la diffusione delle particelle inalata nella circolazione sistemica 1 minuto dopo l'esposizione raggiungendo picchi di penetrazione tra i 10 e i 20 minuti dall'esposizione. Altro plausibile percorso delle particelle in particolar modo ultrafini è che esse si depositino negli alveoli attivando la cascata coagulatoria sanguigna attraverso il meccanismo di infiammazione polmonare o con l'azione diretta sui globuli rossi. Altro elemento informativo derivante dagli studi effettuati è che il meccanismi patogenitici evidenziati sui parametri cardiologici risultano essere più marcati sulle coorti di soggetti anziani (*Magari* 2001).

#### **1.1.4 Legislazione**

A livello legislativo, i limiti di inquinamento da particolato fanno riferimento al PM 10 (a partire dalle direttive europee sull'inquinamento urbano 1999/30/EC e 96/62/EC) e, più recentemente, al PM 2.5 (*WHO* 2006). Nonostante sia ormai dimostrato che i principali effetti nocivi sulla salute sono dovuti alle frazioni granulometriche più fini, queste non sono attualmente soggette a limiti di legge. Ciò è dovuto alla mancanza di una tecnologia appropriata al tipo di misura: le frazioni più fini, infatti, necessitano

di strumenti di laboratorio molto sofisticati e costosi, operativamente non fruibili per il monitoraggio della qualità dell'aria ambientale.

I risultati delle ricerche della comunità scientifica internazionale vengono tradotte nelle Linee Guida ("WHO Air Quality Guidelines", i.e. AQGs) stilate dall'Organizzazione Mondiale della Sanità. Esse sono rivolte alle autorità politiche e hanno lo scopo di indirizzare le autorità preposte alla salvaguardia della qualità dell'aria, all'abbattimento dei livelli di particolato, mediante strategie di contenimento e riduzione delle emissioni di particolato, al fine di limitarne l'impatto sulla salute. I risultati degli studi scientifici vengono dunque tradotti in concentrazioni soglia, che nelle AQGs del 2006 sono organizzate in una serie successiva di quattro obiettivi, di cui riportiamo i valori finali:

PM<sub>10</sub>:     20 µg/m<sup>3</sup> come media annuale  
              50 µg/m<sup>3</sup> come media delle 24 ore

PM<sub>2.5</sub>:     10 µg/m<sup>3</sup> come media annuale  
              25 µg/m<sup>3</sup> come media delle 24 ore

A livello europeo, la Direttiva Quadro 96/62/CE ("Valutazione e gestione della qualità dell'aria ambiente") e le quattro successive direttive figlie forniscono i riferimenti per il monitoraggio delle sostanze inquinanti, per lo scambio dei dati e la definizione dei seguenti concetti base:

- "valore limite": livello che viene scelto sulla base delle conoscenze scientifiche attualmente disponibili e che è tale da evitare, ridurre o prevenire gli effetti dannosi dell'inquinante sulla salute umana e sull'ambiente; tale livello va raggiunto in un tempo previsto e poi non deve essere più superato;
- "valore obiettivo": livello fissato per evitare effetti nocivi a lungo termine sulla salute umana e sull'ambiente; il periodo di raggiungimento di tale livello deve essere più lungo rispetto al periodo necessario al raggiungimento del 'valore limite';
- "soglia di allarme": livello oltre il quale, anche in caso di esposizione di breve durata, vi è un rischio per la salute umana; nel caso del superamento di tale soglia è previsto l'intervento degli Stati membri secondo le disposizioni della 96/62/CE.

In particolare, con il recepimento delle AQGs, la direttiva 99/30/CE stabilisce il limite di soglia per il PM<sub>10</sub>, da raggiungere entro febbraio 2010, pari a 20 µg/m<sup>3</sup> per la



media annuale e a 50  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  per la media giornaliera, con un numero massimo di superamenti consentiti pari a 7 volte per anno.

Nell'aprile 2008 l'Unione Europea ha adottato definitivamente una nuova direttiva (2008/50/EC) che detta limiti di qualità dell'aria con riferimento anche al PM 2.5, in aggiunta a quelli esistenti per il PM10.

Nelle aree urbane l'obiettivo è di ridurre in media del 20% l'esposizione a PM2.5 valutata nel corso del 2010. Il limite temporale fissato è il 2020, a cui si dovrà arrivare attraverso gli obiettivi intermedi di 25  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , (che andava rispettato entro il 2010) e, successivamente, di 20  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , entro il 2015.

La Direttiva 2008/50/EC presenta anche le seguenti caratteristiche:

- La riunificazione di gran parte della legislazione europea esistente sulla qualità dell'aria in una singola direttiva.
- La possibilità di non considerare violazioni degli obiettivi di qualità dell'aria quei superamenti imputabili a fonti naturali quali eruzioni vulcaniche, attività sismiche, attività geotermiche, incendi spontanei, tempeste di vento, aerosol marini o trasporto o risospensione atmosferici di particelle naturali dalle regioni secche.
- Possibilità di prorogare fino al 2011 per il PM10 il rispetto dei limiti di qualità dell'aria, per alcune zone e subordinatamente a certe condizioni che devono essere valutate dalla Commissione Europea.

A livello nazionale, la Direttiva 2008/50/EC è ancora in fase di recepimento. Rimane vigente il Decreto Ministeriale n. 60 del 2/4/2002, emanato per ottemperare alle Direttiva Europea 99/30/CE, che, per il PM10, pone come valore limite giornaliero 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (da non superare più di 35 volte/anno) e come media limite annuale 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ .

## **1.2 Il progetto PM-CARE**

Il progetto PM-CARE (acronimo di Particulate Matter-CARDiovascular and Respiratory Effects) nasce dall'esigenza scientifica di indagare e comprendere i meccanismi fisiopatologici attraverso i quali il particolato atmosferico delle aree urbane determina effetti lesivi sul sistema cardiocircolatorio e sull'apparato

respiratorio. Esso è un Programma di Rilevanza Nazionale (PRIN), co-finanziato dal Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca Scientifica, ed è stato sviluppato mediante la collaborazione di più unità di ricerca (tab. 1), con il coordinamento del Dipartimento di Medicina del Lavoro dell'Università di Milano (sez. Ospedale L. Sacco).

<p><b>1. DIPARTIMENTO DI MEDICINA DEL LAVORO - SEZIONE OSPEDALE SACCO</b>  <b>UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• U.O. CARDIOLOGIA, OSPEDALE L.SACCO</li> <li>• U.O. FISIOPATOLOGIA RESPIRATORIA, OSPEDALE L.SACCO</li> <li>• U.O. PATOLOGIA E ISTOLOGIA UMANA, OSPEDALE L.SACCO</li> <li>• JOINT RESEARCH CENTRE – ISPRA, INSTITUTE FOR HEALTH AND CONSUMER PROTECTION, PHYSICAL AND CHEMICAL EXPOSURE UNIT</li> </ul>
<p><b>2. DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE ED AMBIENTALI</b>  <b>UNIVERSITÀ DELL'INSUBRIA A COMO</b></p>
<p><b>3. DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA, PREVENZIONE E BIOTECNOLOGIE SANITARIE</b>  <b>UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO-BICOCCA</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• U.O. CARDIOLOGIA, OSPEDALE SAN GERARDO, MONZA</li> <li>• U.O. MEDICINA OCCUPAZIONALE, OSPEDALE SAN GERARDO, MONZA</li> </ul>
<p><b>4. DIPARTIMENTO DI MEDICINA DEL LAVORO - SEZIONE CENTRALE</b>  <b>UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• DIPARTIMENTO DI MEDICINA INTERNA</li> <li>• DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACOLOGICHE, FACOLTÀ DI FARMACIA</li> </ul>
<p><b>5. DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA IDRAULICA, AMBIENTALE, INFRASTRUTTURE VIARIE</b>  <b>RILEVAMENTO - FACOLTÀ DI INGEGNERIA CIVILE, AMBIENTALE, POLITECNICO DI MILANO</b></p>
<p><b>6. DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE E CLINICA</b>  <b>UNIVERSITÀ DEGLI STUDI "MAGNA GRAECIA" DI CATANZARO</b></p>

**Tab. 1.2 Unità di Ricerca Coinvolte nel Progetto PM-CARE.**

L'Università degli Studi dell'Insubria ha avuto il ruolo di responsabile del coordinamento del monitoraggio ambientale, che ha riguardato la selezione dei parametri in studio, la scelta della strumentazione necessaria, l'ideazione e realizzazione della cosiddetta Unità Mobile di Monitoraggio, descritta dettagliatamente in seguito, la definizione del protocollo di monitoraggio, la messa in opera dello stesso nonché l'elaborazione dei dati espositivi ottenuti.

Il disegno dello studio ha previsto due monitoraggi dal medesimo protocollo, della durata di 24 ore, effettuati uno durante il periodo freddo ("inverno") e uno durante il periodo caldo ("estate"), nell'ipotesi di trovare condizioni diverse nelle concentrazioni degli inquinanti.

I monitoraggi hanno previsto, in parallelo, misure di tipo clinico e misure di tipo ambientale, nonché un diario delle attività dei soggetti durante le 24 ore di monitoraggio e una scheda tecnica sugli ambienti di vita indoor monitorati.

Al fine di misurare potenziali e specifici effetti su un insieme di parametri clinici e funzionali, sono stati selezionati tre gruppi di pazienti: cardiopatici (gruppo *Cardio*), pneumopatici (gruppo *Pneumo*) e non cardiopatici né pneumopatici (gruppo "*Sani*"). Tutti i soggetti sono stati selezionati escludendo i fumatori, sia attivi che passivi.

Le misure degli inquinanti ambientali sono state di tipo individuale. Questo tipo di valutazione dell'esposizione ha conferito al progetto un approccio innovativo e ne ha rappresentato un importante punto di forza (*Cattaneo* 2010). A tal proposito è opportuno sottolineare che le modalità di misura dell'esposizione sono in genere o di tipo personale o da centralina fissa. Più in dettaglio, le misure personali rappresentano il modo più accurato per la valutazione dell'esposizione ambientale dell'uomo in quanto sono effettuate utilizzando strumentazione in grado di indicare i livelli degli inquinanti di interesse direttamente nella zona respiratoria (*Mosqueron* 2002, *Abou Chakra* 2007, *Nerriere* 2005, *Kim* 2006, *Nerriere* 2007, *Sarnat* 2005, *Sarnat* 2006, *Harrison* 2002, *Jantunen* 1998). Il più importante inconveniente, però, è dato dalle difficoltà tecnico-pratiche, dovute alla necessità di far indossare ai soggetti più strumentazioni per un prelievo in zona respiratoria, senza che esse interferiscano con lo svolgimento delle normali attività quotidiane. Questo aspetto, da un lato, limita lo studio contemporaneo di più co-inquinanti, che hanno invece azione sinergica sull'organismo e andrebbero misurati contestualmente; dall'altro rende difficoltoso il monitoraggio, soprattutto ai soggetti in condizioni di salute cagionevole o per gli anziani.

Dalla parte completamente opposta abbiamo l'esposizione misurata attraverso le stazioni fisse di monitoraggio, che hanno il vantaggio di basarsi su un notevole numero di dati, con un dispendio di risorse umane, economiche e di tempo, abbastanza contenuto (*Sarnat* 2006, *Lipsett* 2006, *Yeatts* 2007). Su queste misure si basano spesso gli studi epidemiologici, che attingono a misure da centraline fisse per l'applicazione di modelli statistici predittivi. L'inconveniente di questa modalità di misura è che l'esposizione è solo un'approssimazione, spesso inadeguata, del quadro espositivo reale di un individuo, in quanto non contempla la valutazione di sorgenti attive nella ristretta zona vitale dell'individuo, soprattutto se il monitoraggio

avviene in ambito indoor (*Delfino* 2004, *Chan* 2004, *Chuang* 2005, *Vallejo* 2006, *Liu* 2007).

Per superare i limiti dell'uno e dell'altro approccio alle misure di esposizione, il team ambientale del progetto PM-CARE ha orientato i suoi sforzi verso la progettazione e la realizzazione di un'unità mobile di monitoraggio (MMU: Mobile Monitoring Unit), che permettesse un tipo di misura individuale, quindi rappresentativa della qualità dell'aria nella zona vitale dei soggetti. È stata quindi utilizzata una trolley in cui sono stati posizionati gli strumenti scelti per l'indagine, che verrà dettagliatamente descritta nel paragrafo 2.1.2.

Le misure per la valutazione individuale sono state articolate come segue:

- Una linea di campionamento gravimetrico con selettore per 4 rilievi integrati sulle 24 ore, per gli intervalli di diametro aerodinamico:  $<0.5\ \mu\text{m}$ ,  $0.5\text{-}1.0\ \mu\text{m}$ ,  $1.0\text{-}2.5\ \mu\text{m}$  e  $2.5\text{-}10\ \mu\text{m}$ ;
- Una linea di campionamento in continuo di concentrazione numerica di particelle con diametro aerodinamico  $>0.02\ \mu\text{m}$ , differenziate rispettivamente in classi dimensionali  $0.02\text{-}1\ \mu\text{m}$ ;  $0.3\text{-}0.5\ \mu\text{m}$ ;  $0.5\text{-}1\ \mu\text{m}$ ;  $1\text{-}2.5\ \mu\text{m}$ ;  $2.5\text{-}10\ \mu\text{m}$ ,  $>10\ \mu\text{m}$ .

A completamento del quadro espositivo dei soggetti, sono stati effettuati ulteriori campionamenti in continuo di monossido di carbonio, ozono, biossido di azoto, temperatura e umidità relativa.

I parametri clinici studiati hanno compreso parametri cardiovascolari (Holter-ECG e pressione arteriosa) e pneumologici (prove di funzionalità respiratoria, DLCO, emogasanalisi), markers dell'infiammazione, indici dello stato coagulatorio e uno studio della metabonomica.

### **1.3 Il progetto di dottorato**

Il presente Progetto di Dottorato di Ricerca in Scienze Ambientali si propone di stabilire l'eventuale relazione tra esposizione a particolato urbano e una selezione di parametri clinici misurati nel progetto PM-CARE. La scelta dei parametri clinici più significativi, così come l'interpretazione dei risultati, si basa sulla conoscenza del fenomeno e dei risultati presenti in letteratura, ed è stata effettuata in stretta collaborazione con il gruppo di ricerca clinico del progetto.

Sono stati individuati due gruppi di parametri: il primo è quello ematochimico, ovvero il risultato dei prelievi sanguigni effettuati sui soggetti alla fine del protocollo di monitoraggio; il secondo è quello cardiologico, ottenuto dai risultati dell'elettrocardiogramma secondo Holter, che rileva gli indici della funzionalità cardiaca in acquisizione continua durante le 24 ore del monitoraggio.

### **1.3.1 Parametri ematochimici**

#### ***1.3.1.1 Indicatori dell'infiammazione sistemica***

Come già descritto nel paragrafo, è stato dimostrato che lo stress ossidativo a carico delle cellule epiteliali polmonari, dovuto al particolato, e il loro contatto diretto con quest'ultimo innescerebbero il rilascio di fattori pro-infiammatori, che si tradurrebbe in una *reazione infiammatoria sistemica*, con il coinvolgimento del midollo osseo ematopoietico e del fegato. Quest'ultimo produce, fra le altre, la **proteina C reattiva** (hs-PCR), che è uno dei principali indici di infiammazione sistemica e del danno tissutale ed è associata al rischio di eventi coronarici acuti.

La PCR è stata dunque individuata come parametro di interesse nell'intero set di parametri infiammatori. Il parametro viene considerato normale se  $< 10$  mg/l.

#### ***1.3.1.2 Indicatori della coagulazione sanguigna***

Lo stato di *ipercoagulazione* sanguigna, che può essere dovuto all'infiammazione polmonare in associazione all'esposizione a PM, può essere valutato analizzando le concentrazioni ematiche di **fibrinogeno**. Il fibrinogeno è essenziale nella coagulazione del sangue poiché, tramite un processo di polimerizzazione, viene trasformato in fibrina, responsabile della coagulazione del sangue e della formazione di trombi. Un eccesso di fibrinogeno risulta quindi indice di una predisposizione all'attivazione delle piastrine e all'evento trombotico, con conseguente incremento del rischio di sindrome coronaria e di infarto del miocardio. Il range di normalità di questo parametro è 200 - 400 mg/dl.

### **1.3.2 Parametri cardiologici**

Come già descritto in precedenza, i risultati degli studi scientifici condotti in materia suggeriscono che l'induzione di aritmie cardiache fatali da parte del PM sia dovuta a uno squilibrio della regolazione del ritmo da parte del sistema nervoso autonomo (SNA). L'analisi della variabilità della frequenza cardiaca (FC), più precisamente

dell'intervallo tra battiti cardiaci successivi (intervallo RR) (*Heart Rate Variability*, HRV), è un metodo non-invasivo ampiamente utilizzato per indagare il controllo del sistema nervoso autonomo sul ritmo cardiaco e verificare le alterazioni che potrebbero essere alla base dell'associazione tra l'esposizione a materiale particolato e la mortalità per cause cardiache.

La HRV può essere valutata nel dominio del tempo e nel dominio della frequenza. La valutazione nel dominio del tempo si basa sull'analisi degli intervalli tra battiti normali (NN). La frequenza cardiaca (FC) e la SDNN (Deviazione Standard dell'intervallo tra due battiti normali NN) sono due delle variabili di più comune utilizzo. In particolare la SDNN è un indice complessivo della funzionalità del cuore: la sua diminuzione segnala una riduzione della variabilità della frequenza cardiaca e un diminuito controllo della bilancia simpato-vagale. Parecchi studi scientifici hanno associato la SDNN ad un aumentato rischio di mortalità per cause cardiovascolari, inclusa la morte cardiaca improvvisa. I valori di riferimento della frequenza cardiaca sono 60-100 bpm mentre per la SDNN sono  $141 \pm 69$  ms.

## ***CAPITOLO 2***

# **MATERIALI E METODI**

### **2.1 Indagine ambientale**

L'esposizione valutata nel progetto PM-CARE è di tipo individuale, ovvero misurata nelle immediate vicinanze dello spazio vitale dell'individuo. Nel caso del progetto PM-CARE, infatti, il concetto di esposizione personale non risulta appropriato in quanto prevederebbe un campionamento ambientale nella zona strettamente respiratoria del soggetto (sfera di 30 cm con il baricentro tra naso e bocca).

La valutazione dell'esposizione individuale, dunque, ha richiesto la messa a punto di un sistema di monitoraggio mobile, realizzato attraverso una trolley (Monitoring Mobile Unit) studiata in modo da contenere tutti gli strumenti di misura selezionati.

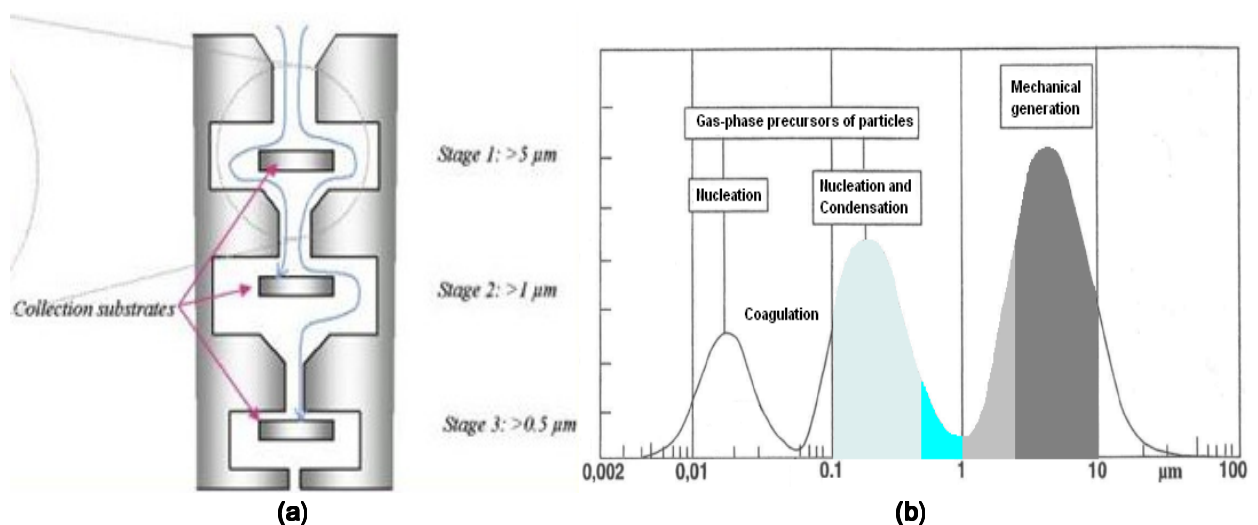
I criteri alla base della scelta di questi strumenti sono stati non solo la tecnologia più avanzata e scientificamente affidabile, ma anche altri imprescindibili fattori legati alla strategia del monitoraggio. Gli strumenti infatti avrebbero dovuto avere un'autonomia di acquisizione di almeno 24 ore, avere caratteristiche geometriche e strutturali tali da essere trasportabili dai soggetti nei loro spostamenti, e infine che fossero poco rumorosi, in modo da non arrecare stress acustico ai volontari e di impedirne il riposo notturno.

## 2.1.1 Strumentazione

### 2.1.1.1 Misure di concentrazione gravimetrica di particolato

Per quanto riguarda le misure gravimetriche di particolato, ci si è indirizzati verso i selettori multistadio, ovvero quelli che permettono la raccolta contemporanea di più frazioni con diverso diametro aerodinamico. Fra essi sono stati considerati i selettori operanti col maggior flusso di campionamento, al fine di ottenere un campione più consistente di polvere sulla membrana dello strumento, con conseguente incremento dell'accuratezza dell'analisi gravimetrica. Dopo un confronto sperimentale comparativo tra due strumenti, selezionati con i criteri sopra descritti, è stato scelto il selettore Personal Cascade Impactor Sampler (PCIS; SKC, Inc.) (*Misra* 2002), che ha offerto la possibilità di raccogliere anche frazioni di particelle con diametro aerodinamico pari a  $1\text{ }\mu\text{m}$  e  $0.5\text{ }\mu\text{m}$ , oltre ad aver minor peso e ingombro (*Cattaneo* 2010, *Garramone* 2007).

Lo strumento scelto è costituito da un cilindro contenente quattro piatti per la selezione ad impatto e da un quinto per la filtrazione finale. Il criterio di funzionamento su cui si basa lo strumento consiste nell'accelerazione delle particelle che attraversano una serie di fenditure rettangolari, impattando in filtri intermedi su cui si depositano, in base al loro diametro aerodinamico, suddividendosi nelle corrispondenti frazioni di particolato. Il filtro finale raccoglie le particelle sfuggite ai filtri intermedi (fig. 2.1(a)).



**Fig. 2.1(a-b) Schema di funzionamento del Contatore Ottico di Particelle (a) e range dimensionale delle particelle che è in grado di rilevare (b).**



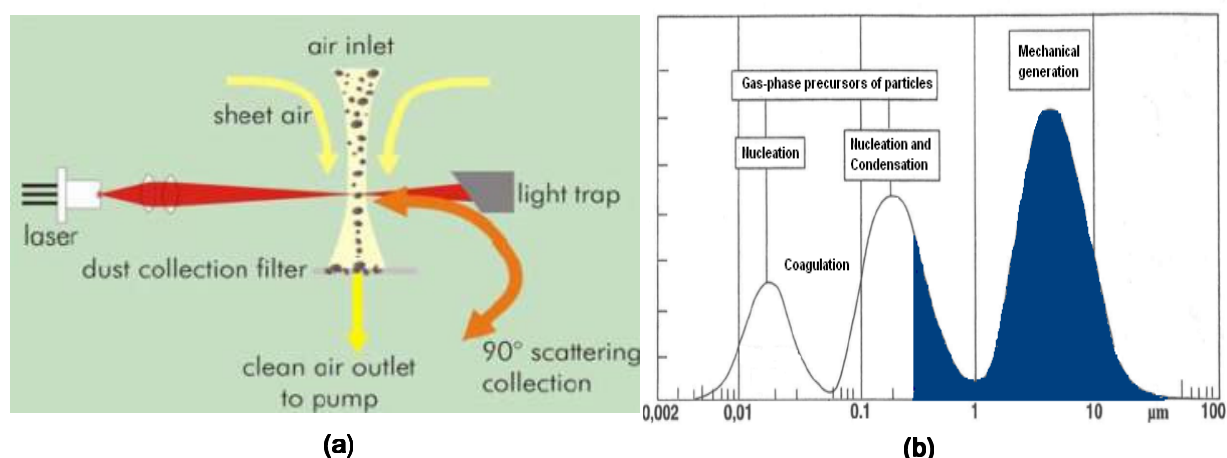
Le frazioni granulometriche raccolte sui filtri appartengono quindi alle classi di diametro aerodinamico:  $<0,5 \mu\text{m}$ ;  $0,5\text{-}1 \mu\text{m}$ ;  $1\text{-}2,5 \mu\text{m}$ ;  $2,5\text{-}5 \mu\text{m}$ ;  $5\text{-}10 \mu\text{m}$ ;  $<10 \mu\text{m}$  (fig. 2.1(b)).

La pesatura dei filtri è stata effettuata secondo le disposizioni del D.M. 2 aprile 2002, n. 60 e della normativa europea (EN12341). I filtri sono stati sottoposti a condizionamento a  $20^\circ\text{C}$  e al 50% di umidità, per almeno 48 ore, sia prima che dopo il campionamento.

### **2.1.1.2 Misure di concentrazione numerica di particolato**

La misura della concentrazione di materia particolare in termini di numerosità è stata effettuata mediante dispositivi ottici. Sono stati selezionati due tipi diversi di strumenti in modo da poter coprire un ampio range di diametri aerodinamici, a partire da  $0.02 \mu\text{m}$ . Per entrambi gli strumenti, i criteri di selezione più importanti sono stati l'essere maneggevole e le piccole dimensioni.

Il primo dei due strumenti scelti è un Contatore Ottico di Particelle (OPC) (mod. Handheld 3016, Lighthouse Worldwide Sol.), con modalità di acquisizione di tipo attivo. Esso si basa sul principio della diffrazione ottica (light scattering) di un raggio di luce piano, prodotto da un diodo laser focalizzato sul flusso d'aria di cui si vuole rilevare la concentrazione particellare (flusso di aspirazione =  $2.83 \text{ l/min}$ ) (fig 2.2(a)).



**Fig. 2.2(a-b) Schema di funzionamento del Contatore Ottico di Particelle (a) e range dimensionale delle particelle che è in grado di rilevare (b).**

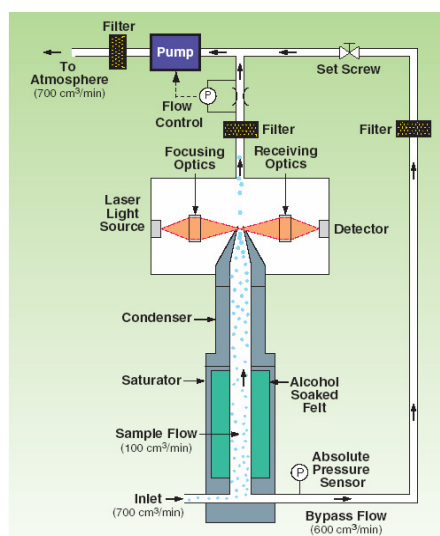
Ogni segnale è contato e classificato in 6 differenti frazioni gralunometriche ovvero 0.3-0.5; 0.5-1.0; 1.0-2.5; 2.5-5.0; 5.0-10.0; > 10.0  $\mu\text{m}$  (fig 2.2(b)).

I tempi di elaborazione del segnale sono estremamente rapidi e permettono di ottenere misure anche ogni secondo, fornendo il dato in modo continuo sul periodo di acquisizione.

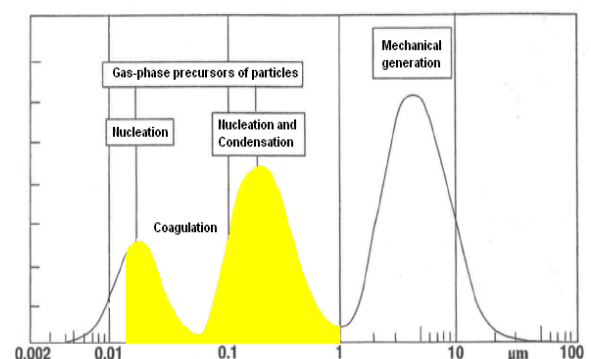
Il secondo contatore ottico scelto è in grado di quantificare il numero di particelle nella frazione più fine ( $0.02 \mu\text{m} < d_a < 1 \mu\text{m}$ ) (fig. 2.3(b)) ed è un Contatore di Particelle a Condensazione (CPC).

Anch'esso, come il precedente, si basa sul metodo della diffrazione ottica, e, al fine di rilevare anche le particelle del range ultrafine, sfrutta l'accorgimento di utilizzare l'isopropanolo per amplificare il diametro particellare, tramite la condensazione dei suoi vapori sulla superficie delle particelle.

Le particelle attraversano una camera riscaldata, dopo essere state aspirate da una pompa all'interno dello strumento. All'interno di tale camera è presente un'atmosfera satura di vapore di alcol isopropilico. La miscela vapore-particelle possa quindi in una camera raffreddata in cui il vapore diventa soprassaturo e condensa sulle particelle. L'accresciuto volume diventa quindi tale da rendere conteggiabili anche le particelle ultrafini, mediante un sistema ottico analogo a quello dei contatori OPC (fig 2.3(a)).



(a)



(b)

**Fig. 2.3(a-b) Schema di funzionamento del Contatore di Particelle a Condensazione (a) e range dimensionale delle particelle che è in grado di rilevare (b).**

A differenza dell'OPC, comunque, questo strumento non permette la differenziazione in classi di diverso diametro aerodinamico, per cui non permette di ottenere informazioni riguardo la distribuzione dimensionale della particelle contate.

#### ***2.1.1.3 Misura dei conquinanti e dei parametri microclimatici***

A completamento del quadro di esposizione dei soggetti, sono stati monitorati anche i livelli di CO, NO<sub>2</sub> e O<sub>3</sub>, di cui descriviamo brevemente la strumentazione, sebbene non siano stati oggetti di studio del presente progetto di dottorato.

Le concentrazioni di CO gassoso sono state misurate mediante un analizzatore passivo costituito da una cella elettrochimica (CO Measurer mod. T15v; Langan Products, Inc.), che ha fornito un monitoraggio in continuo sulle 24 ore.

Le misure di NO<sub>2</sub> sono state effettuate mediante un campionatore diffusivo a simmetria radiale (Radiello<sup>®</sup>), che ha fornito un tipo di misura integrato sul periodo di monitoraggio, per assenza sul mercato di campionatori in continuo con caratteristiche adeguate alle esigenze tecniche dello studio.

Infine, i livelli di ozono (O<sub>3</sub>) sono stati registrati in modalità continua con uno strumento provvisto di un sensore a semiconduttore adatto alle basse concentrazioni (mod. Servies 500 Handheld Monitors, Aeroqual Ltd.).

La temperatura è stata misurata in continuo sfruttando una sonda in dotazione sia dell'analizzatore di CO che del contatore ottico di particelle (OPC). Quest'ultimo strumento ha inoltre consentito il rilevamento dell'umidità relativa, mediante un sensore in acquisizione continua.

#### **2.1.2 Unità mobile di monitoraggio**

Gli strumenti selezionati sono stati allocati all'interno di una valigia provvista di ruote (trolley) (dimensioni 90x45x31cm, peso in condizioni operative pari a circa 25 Kg).

Questo prototipo di unità mobile di monitoraggio è facilmente trasportabile dai soggetti nei loro spostamenti all'interno delle loro abitazioni, mentre talvolta è stato necessario l'aiuto del personale tecnico per gli spostamenti outdoor (automobile e mezzi pubblici), in base alle caratteristiche fisiche dei volontari.

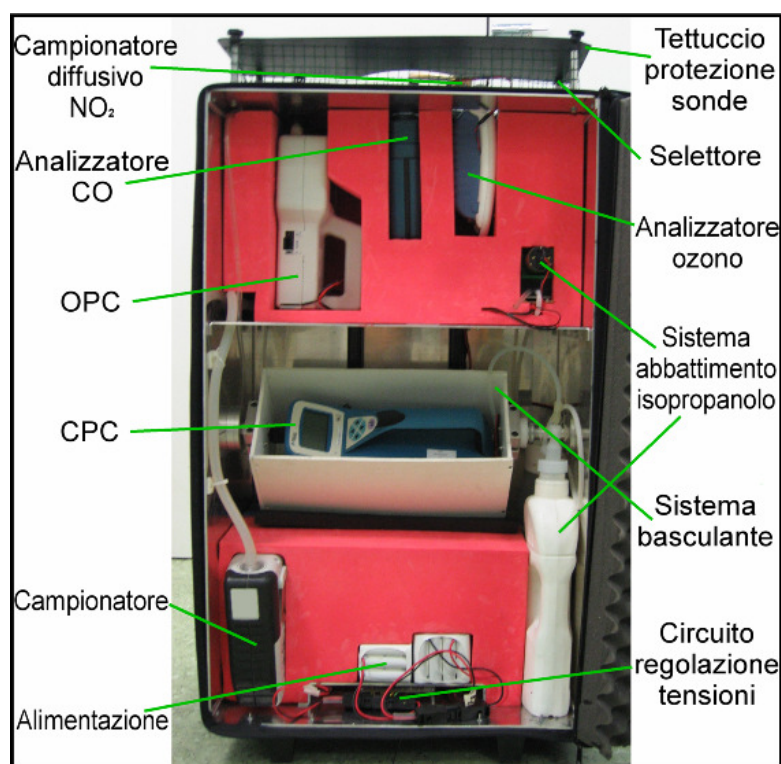
Le sonde degli strumenti che hanno misurato PM, temperatura, umidità relativa e NO<sub>2</sub> sono state posizionate nella superficie superiore della trolley, coperte da un rivestimento al fine di proteggerlo dalla pioggia o da eventuali urti.

Per quanto riguarda invece gli strumenti per le misure di  $O_3$  e CO è stato verificato che il loro posizionamento all'interno della trolley produceva errori di misura, probabilmente a causa del surriscaldamento interno, pertanto essi sono stati posizionati esternamente alla trolley.

Infine, il contatore di particelle a condensazione ha richiesto due particolari accorgimenti: 1. un contenitore basculante, necessario per impedire a un sistema di sicurezza interno allo strumento di bloccare l'acquisizione qualora lo strumento superasse un determinato angolo di inclinazione; 2. l'aggiunta di un sistema di abbattimento dei vapori di isopropanolo generati dal CPC, per ragioni di sicurezza nei confronti dei volontari. L'autonomia di funzionamento dell'unità mobile di monitoraggio è superiore alle 24 ore, ad eccezione del CPC che richiede il refill dell'isopropanolo ogni 12 ore circa. Inoltre la trolley è stata isolata acusticamente e ammortizzata mediante ruote pneumatiche con camera d'aria.

Il tempo di acquisizione degli strumenti in modalità continua è stato fissato di un valore ogni 30 secondi.

L'unità mobile di monitoraggio è mostrata in figura 2.4.



**Fig. 2.4 Unità Mobile di Monitoraggio (MMU) per la misura dell'esposizione individuale ad inquinanti urbani aerodispersi.**

### **2.1.3 Protocollo di indagine ambientale**

L'unità mobile di monitoraggio è stata consegnata al domicilio dei soggetti partecipanti allo studio all'inizio del giorno di campionamento e ritirata nella prima mattina del giorno successivo dal personale tecnico specializzato, afferente al progetto.

Altro compito del personale tecnico è stato di compilare una scheda tecnica cartacea (check-list) al fine di registrare le caratteristiche più importanti degli ambienti di vita dei soggetti. Le principali informazioni registrate sono state: le caratteristiche strutturali dell'abitazione; le caratteristiche della zona in cui si trova l'abitazione (area, intensità del traffico, presenza di impianti inquinanti, densità e altezza degli edifici adiacenti); la qualità dei serramenti; la presenza di prese d'aria o di finestre e dove esse fossero affacciate; la presenza di sorgenti inquinanti indoor (come caldaie, caminetti, tappeti); la presenza di fumatori in casa.

A completamento del quadro espositivo è stato chiesto ai soggetti di compilare un diario delle attività (Time Activity Diary o TAD), registrandole per periodi di 30'. Le attività essenziali indicate nel TAD sono state: fumo di sigarette in casa; pulizie domestiche; apertura delle finestre; accensione di sorgenti di combustione indoor (caminetti, caldaie); uso cucina/forno con o senza cappa di aspirazione fumi.

Al fine di studiare la correlazione tra livelli outdoor e indoor, sono stati registrati i livelli degli inquinanti indoor corrispondenti alle giornate di monitoraggio attingendo dall'archivio dell'Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente (ARPA) – Regione Lombardia.

Infine, sono state rilevate le coordinate geografiche delle abitazioni, per una possibile futura modellizzazione dei livelli di esposizione degli inquinanti in studio, da estendere alla popolazione generale.

## **2.2 Indagine clinica**

### **2.2.1 Selezione del campione**

La popolazione studiata è stata arruolata in due ospedali della Lombardia (l'Azienda Ospedaliera "Luigi Sacco" di Milano e l'Azienda Ospedaliera "San Gerardo" di Monza), e raggruppata secondo lo stato di salute in soggetti che soffrono di patologie cardiache ischemiche croniche, in soggetti che soffrono di asma o patologie polmonari croniche ostruttive (BPCO), e in soggetti senza diagnosi della

patologie appena menzionate. Durante una visita medica ambulatoriale preliminare, ai soggetti è stato somministrato un questionario relativo alle caratteristiche antropometriche, fisiologiche e anamnestiche, all'attuale terapia farmacologica, al livello scolastico, alla posizione lavorativa, all'attività sportiva, all'abitudine all'alcool e al fumo passivo o precedentemente attivo. Inoltre sono stati contestualmente effettuati l'elettrocardiogramma, le prove di funzionalità respiratoria e un esame del sangue di routine.

I criteri generali di esclusione hanno incluso i fumatori attivi (o gli ex-fumatori da meno di 6 mesi), scarso controllo glicemico, insufficienza renale severa, anemia moderata o severa, disordini nella coagulazione, squilibrio elettrolitico.

I soggetti del gruppo "Cardio" sono stati scelti se affetti da patologia ischemica cronica, definita da: 1) diagnosi di coronaropatia arteriosa (CAD) ; 2) angina cronica stabile; 3) precedente intervento di Angioplastica Coronarica Transluminale Percutanea (PTCA) o di bypass arterioso antecedente di 6 mesi; o 4) infarto del miocardio antecedente di 6 mesi alla partecipazione allo studio. Criteri di esclusione specifici per questo gruppo sono l'angina instabile, l'angina di classe 3 o 4 della classificazione CANADIAN, eventi cardiovascolari acuti nei precedenti 6 mesi, insufficienza cardiaca in classe III o IV della classificazione NYHA, terapia anticoagulante, pacemaker o defibrillatore cardiaco impiantabile, fibrillazioni croniche atriali, moderato-severa BPCO o asma.

I soggetti del gruppo "Pneumo" sono stati considerati arruolabili se caratterizzati da: 1) BPCO media o severa (secondo la definizione delle linee guida GOLD); 2) asma medio o severo (secondo la definizione delle linee guida GINA). Criteri di esclusione specifici per questo gruppo sono stati la capacità vitale inferiore a due litri e patologia cardiaca ischemica cronica.

I soggetti del gruppo "Sani" sono stati selezionati se caratterizzati da: 1) ECG normale e assenza di patologie cardiovascolari; 2) test di funzionalità respiratoria nella norma e assenza di patologie polmonari. Specifici criteri di esclusione sono stati: patologie delle prime vie aeree, patologie di tipo renale, allergie e diabete mellito.

### **2.2.2 Protocollo di indagine clinica**

Il monitoraggio clinico ha previsto sia misure di tipo continuo che misure effettuate alla fine delle 24 ore di monitoraggio.

I parametri misurati in modo continuo sono:

- Attività svolte durante la giornata (indicativi di possibili variazioni di parametri clinici oltre che indicativi di possibili sorgenti di esposizione e permanenza nei diversi microambienti), sintomi, terapia, registrati mediante diario clinico/espositivo;
- Pressione arteriosa registrata in sei momenti della giornata;
- Attività cardiaca con valutazione dei parametri standard mediante elettrocardiogramma secondo Holter;
- Saturazione ossiemoglobinica mediante saturimetro.

I parametri misurati al termine delle 24 ore di monitoraggio sono:

- Parametri infiammatori (mediante prelievo venoso);
- Parametri della coagulazione (mediante prelievo venoso);
- Parametri ematici (mediante prelievo venoso);
- Parametri respiratori (mediante prove di funzionalità respiratoria e prelievo arterioso);
- Analisi istologica, citochimica e di citochine infiammatorie su campioni di escreato;
- Pattern metabolico di plasma, urine ed escreato (mediante spettrometria in RMN).

## **2.3 Trattamento statistico**

L'approccio statistico è stato suddiviso in tre fasi: a) quella preliminare e descrittiva, necessaria per conoscere l'andamento dei dati, b) quella relativa ai risultati integrati sulle 24 ore o di fine monitoraggio (dati discreti) e infine c) la fase relativa allo studio dei dati in continuo registrati nelle 24 ore di monitoraggio sui parametri ambientali (contatori numerici di particelle) e cardiaci (ECG-Holter e ambientali).

Il livello di significatività scelto è  $p < 0.05$ .

Il software statistico utilizzato per le analisi dei dati discreti è Systat SPSS.18, mentre i dati continui sono stati studiati mediante MS Excel 2007.

### **2.3.1 Analisi descrittiva**

L'analisi descrittiva del campione di misure ha previsto la verifica della normalità delle distribuzioni dei dati e della loro log-normalità, mediante il test di Kolmogorov-Smirnov. Sulla base dei risultati del test, i dati sono stati log-trasformati per ottenere

la distribuzione normale, ove possibile, e poter applicare la statistica parametrica. Quando invece neanche la log-trasformazione ha reso normale la distribuzione dei dati, è stata applicata la statistica non parametrica.

Lo studio delle descrittive ha permesso di identificare la tendenza centrale dei dati e la presenza di eventuali outliers.

Sono stati applicati il test di Student (parametrico) o il test di Wilcoxon (non parametrico) al fine di verificare le differenze nei due diversi periodi di monitoraggio (stagione calda e stagione fredda).

Per valutare invece la differenza tra i gruppi in studio (Cardio, Pneumo e “Sani”) è stato applicato il metodo dell’analisi della varianza (ANOVA) (parametrico) o il test di Kruskal-Wallis (non parametrico).

### 2.3.2 Analisi dei dati discreti

L’analisi dei dati raccolti nel progetto PM-CARE ha richiesto la ricerca della possibile associazione tra i dati di esposizione individuale e i dati clinici raccolti durante i due monitoraggi, previsti dal protocollo di indagine. L’approccio statistico più appropriato per il disegno del progetto si basa sui **modelli lineari misti per misure ripetute** (*Jiang J 2007*). Essi richiamano il modello di regressione lineare, esprimibile con l’equazione  $y=X\beta+\epsilon$ , in cui  $y$  è un vettore di osservazioni,  $X$  è una matrice di covariate note,  $\beta$  è un vettore di coefficienti di regressione ignoti ed  $\epsilon$  è un vettore di errori (non osservabili e random). Nel modello di regressione lineare, i coefficienti di regressione sono considerati fissi, ma, nel caso in cui le osservazioni risultino correlate, alcuni coefficienti devono essere considerati random e non osservabili. Il nostro studio, in modo analogo a molti studi clinici, coinvolge osservazioni raccolte sugli stessi soggetti in due monitoraggi nell’arco di un anno ed è pertanto ragionevole assumere che ad ogni soggetto sia associato un effetto random il cui valore sia non osservabile. In una tale situazione è dunque opportuno applicare i modelli lineari misti per misure ripetute, al fine di tener conto delle correlazioni fra le osservazioni.

Un modello lineare misto, che può essere gaussiano o non-gaussiano, è espresso, in forma generica, come  $y=X\beta+Z\alpha+\epsilon$ , in cui  $y$  è un vettore di osservazioni,  $X$  è una matrice di covariate note,  $\beta$  è un vettore di coefficienti di regressioni ignoti, usualmente chiamati *effetti fissi*,  $Z$  è una matrice nota,  $\alpha$  è un vettore di *effetti*



*random* ed  $\varepsilon$  è un vettore di *errori*, (sia  $\alpha$  che  $\varepsilon$  sono non-osservabili). Rispetto a un modello di regressione lineare la differenza sostanziale consiste in  $Z$ , che può assumere forme diverse, creando una ricca classe di modelli.

Come assunzioni di base dei modelli lineari misti si ha: 1) che gli effetti random e gli errori abbiano media zero e varianze finite; 2) che  $\alpha$  e  $\varepsilon$  siano non correlate.

Per la verifica della bontà del modello così come la selezione del modello migliore all'interno di un set di possibili modelli, si utilizzano i cosiddetti criteri informativi, che possono essere basati o meno sul principio di massima verosimiglianza. In particolare, per le misure ripetute, lo studio di Ehlers del 2004, basato su simulazioni, ha indicato che il criterio di Shwartz e Bayes (BIC) è in genere preferibile, sebbene, per campioni di numerosità  $<20$  e con un solo gruppo, sia più indicato il Criterio di Hurvich e Tsai (AICc) (*Garson D* 2008).

Qualsiasi sia il criterio informativo scelto, più basso è il valore ottenuto migliore è il modello. Su tale base si può scegliere di aggiungere o togliere un parametro dal modello, guardando il decrescere o il crescere del valore del criterio informativo scelto, oppure si può scegliere il modello più parsimonioso (ovvero con meno parametri) rispetto a un altro che si adatti ugualmente bene ai dati ma con un numero maggiore di parametri.

Nelle nostre analisi, dunque, la variabilità intra-soggetto, dovuta alla ripetizione dei monitoraggi, è stata considerata inserendo la variabile "soggetto" come effetto random del modello.

Di ulteriore interesse, inoltre, è stata la valutazione di una possibile differenza degli effetti nei tre gruppi di soggetti in studio. In altre parole è stata valutata l'eventuale maggiore suscettibilità al particolato di un gruppo rispetto ad un altro. Questo approfondimento è stato effettuato inserendo fra le variabili indipendenti il termine di interazione PM\*gruppo, che, se significativo, avrebbe indicato un'effettiva differenza di reazione all'esposizione in base alla presenza o meno delle patologia considerate. Il comportamento dei singoli gruppi è stato evidenziato attraverso il metodo dei contrasti, che, associati all'interazione, permettono di valutare la significatività dell'effetto del PM su ogni gruppo.

Oltre all'interazione tra PM e gruppo, le variabili indipendenti introdotte nei modelli misti per misure ripetute sono i confondenti e/o modificatori d'effetto individuati sulle basi della letteratura scientifica e della pratica medica. Questi sono le variabili di tipo

microclimatico, quali temperatura e umidità relativa; i fattori antropomorfici, cioè gruppo, genere, età e Body Mass Index (BMI) e infine la terapia farmacologica.

Una volta testate, queste variabili indipendenti sono state escluse dal modello se risultate non associate alla variabile dipendente, fatta eccezione per i parametri microclimatici che sono stati in ogni caso mantenuti.

I dati ambientali in continuo relativi alle 24 ore del monitoraggio sono stati divisi in due periodi, relativi al giorno e alla notte, in corrispondenza del passaggio veglia-sonno di ciascun soggetto. Sono quindi state testate le associazioni con modelli diversi per le diverse fasce temporali di esposizione, diversificabili sia in termini di ritmo circadiano dell'organismo umano che in termini di attività e quindi di diversi livelli e sorgenti d'esposizione. Inoltre tale approccio può indicare un possibile tempo di latenza tra evento di esposizione e la relativa reazione dell'organismo.

Infine, per i parametri clinici cardiologici, essendo anch'essi di tipo continuo, è stato possibile associare diversi periodi di esposizione a diversi periodi di risposta delle funzionalità cardiache. In particolare, sono stati sviluppati i modelli relativi allo studio dell'associazione tra i valori medi di: 1. esposizione diurna e parametro cardiologico diurno, 2. esposizione diurna e parametro cardiologico notturno, 3. esposizione notturna e parametro cardiologico notturno.

### **2.3.3 Analisi dei dati in continuo**

Lo studio dei dati in continuo ha richiesto che le scale dei tempi del monitoraggio ambientale e del corrispondente monitoraggio clinico fossero sovrapponibili per ogni soggetto e sessione di monitoraggio. E' stato quindi scelto univocamente l'intervallo di tempo con cui mediare il dato grezzo fornito dagli strumenti (5 msec per l'ECG-Holter e 30 sec per il contatore ottico di particelle), scegliendo di mediare i dati ogni 5 minuti. Infine, si è fatto coincidere il tempo di acquisizione in modo che l'asse dei tempi fosse uno solo.

#### ***2.3.3.1 Approccio grafico***

Si è quindi proceduto con il confronto grafico delle curve continue in funzione del tempo, al fine di evidenziare a livello visivo la possibile presenza di una relazione causa-effetto tra esposizione e risposta clinica, soprattutto nel caso di picchi nella concentrazione di particolato.

### ***2.3.3.2 Studio della correlazione***

Il passo successivo è stato lo studio della correlazione lineare tra i livelli di particolato e i valori dei parametri cardiologici scelti. Sono state verificate correlazioni con diversi shifts temporali rispetto all'inizio del monitoraggio, cioè il momento di inizio del tracciato cardiaco è stato spostato di intervalli di tempo definiti, in modo da cercare di individuare il tempo di latenza tra esposizione e risposta nell'andamento del cuore. La scelta degli shifts temporali è stata effettuata sulle basi dei risultati dei modelli lineari misti per misure ripetute per i dati discreti.

Si è andata a indagare, quindi, la presenza di intervalli temporali che più frequentemente mostrassero un coefficiente di correlazione (o di Pearson) in valore assoluto maggiore di 0,5.

## ***CAPITOLO 3***

# **RISULTATI E DISCUSSIONE**

### **3.1 Analisi dei livelli di particolato ambientale del progetto PM-CARE**

#### **3.1.1 Variazione tra l'esposizione nella stagione calda e nella stagione fredda**

I risultati descrittivi delle misure di particolato urbano individuale del progetto PM-CARE, durante il periodo in cui i riscaldamenti sono accesi ("stagione fredda") e spenti ("stagione calda"), sono riportati in tabella 3.1 in termini di mediane [25°-75° percentili]. I parametri sono stati suddivisi in base al metodo di campionamento: concentrazione di massa (con misure gravimetriche integrate nelle 24 ore di monitoraggio) per il  $PM_{0.5}$ ,  $PM_1$ ,  $PM_{2.5}$ ,  $PM_{10}$ ; concentrazione numerica per diversi diametri aerodinamici del particolato (con conteggio delle particelle per unità di volume con contatore a condensazione (CPC) per la frazione ultrafine (UFP), con contatore ottico (OPC) per le frazioni fine e grossolana). Sono inoltre riportate le medie sulle 24 ore di temperatura e umidità relativa.

La differenza tra il monitoraggio nella stagione calda e il corrispondente nella stagione fredda è stato testato mediante il test di Wilcoxon per distribuzioni non parametriche (tab. 3.1).

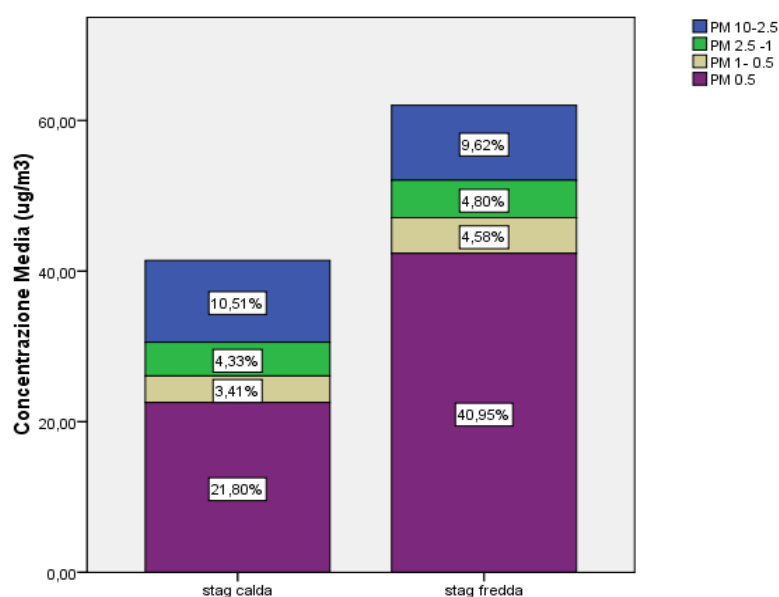
Parametri ambientali		Totale	Stag calda	Stag fredda	$\Delta_{\text{invernale}}\%$
		Mediana 25°-75°	Mediana 25°-75°	Mediana 25°-75°	Media
Concentrazione di massa [ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ]	PM 0.5	27.1 17.8-42.4	19.7 15.4-28.1	38.7 24.5-52.4	89 (*)
	PM 1	31.1 20.5-46.7	22.7 17.8-31.8	43.7 28.7-58.7	81 (*)
	PM 2.5	35.2 24.6-50.7	26.8 21.4-37.7	49.8 33.7-66.3	70 (*)
	PM 10	45.7 32.5-63.0	35.5 29.3-51.0	58.0 41.7-79.0	50 (*)
Concentrazione numerica [ $\#/\text{cm}^3$ ]	UFP [0.02-1 $\mu\text{m}$ ]	19443 14520-30328	16969 13526-22082	24958 17290-34025	37(*)
	FP [0.3-0.5 $\mu\text{m}$ ]	101.2 58.0-184.8	73.1 41.1-101.1	172.9 102.1-249.3	141 (*)
	FP [0.5-1.0 $\mu\text{m}$ ]	9.1 4.2-17.3	4.7 3.1-9.0	15.4 9.3-25.1	209 (*)
	FP [1.0-2.5 $\mu\text{m}$ ]	0.552 0.335-0.871	0.388 0.238- 0.550	0.764 0.563- 1.099	80 (*)
	CP [2.5-5.0 $\mu\text{m}$ ]	0.203 0.147-0.326	0.177 0.131- 0.275	0.233 0.163- 0.369	27 (*)
	CP [5-10 $\mu\text{m}$ ]	0.017 0.009-0.118	0.015 0.010- 0.093	0.018 0.092- 0.138	56 (*)
	CP [>10 $\mu\text{m}$ ]	0.006 0.005-0.008	0.006 0.004- 0.007	0.006 0.005- 0.009	7
Parametri microclimatici	Temperatura [C°]	25.3 23.0-28.5	28.5 26.9-30.3	23.1 27.5-23.1	-18 (*)
	Umidità Relativa [%]	37.4 33.5-43.3	42.5 37.9-45.0	34.3 31.6-37.3	-17(*)

**Tab 3.1 Mediane, 25° e 75° percentili, del particolato urbano per la totalità delle misure e per periodo di monitoraggio (Stagione calda e Stagione fredda) del progetto PM-CARE. Si riportano inoltre gli incrementi medi dei livelli invernali rispetto a quelli estivi. L'asterisco indica una differenza staticamente significativa tra i due monitoraggi (Wilcoxon test,  $p < 0.05$ ).**

Un confronto con i limiti giornalieri indicati dalle Linee Guida della WHO (WHO 2006) mostra che il livello di PM2.5 relativo all'esposizione personale dei soggetti ha superato, in entrambi i periodi di monitoraggio, il limite raccomandato (pari a 25

$\mu\text{g}/\text{m}^3$ ). I livelli indicati invece per il PM10 sono stati superati solo durante il periodo invernale.

I risultati delle misure mostrano un evidente trend stagionale con valori mediamente più alti nel periodo freddo rispetto a quello caldo. Tale incremento è stato particolarmente marcato per la frazione di particolato con diametro aerodinamico compreso tra 0.3 e 0.1  $\mu\text{m}$ , come mostrano gli incrementi invernali rispetto all'estate. La differenza è risultata comunque sempre statisticamente significativa, ad eccezione della frazione  $\text{CP}>10\mu\text{m}$ .



**Fig. 3.1 Media delle concentrazioni individuali del PM10, suddiviso in frazioni granulometriche, per i due monitoraggi del progetto PM-CARE. Le misure sono di tipo gravimetrico ( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ).**

Il grafico mostrato in fig. 3.1, oltre a evidenziare le differenze dei livelli di concentrazione per il PM10 durante i due monitoraggi, mostra l'importanza del contributo delle diverse frazioni al particolato che costituisce complessivamente il PM10. La frazione che compone gran parte del PM10 è quella con diametro aerodinamico minore di 0.5  $\mu\text{m}$ , corrispondente alla moda di accumulazione.

### 3.1.2 Variazione dell'esposizione tra il giorno e la notte

Di seguito riportiamo l'andamento delle concentrazioni numeriche medie ponderate durante il giorno e la notte, disponibili per i parametri monitorati in continuo con contatore ottico di particelle (OPC). Il passaggio tra il periodo diurno e quello notturno è stato fatto coincidere con il passaggio veglia-sonno di ciascun soggetto. I risultati in figura 3.2 mostrano che nel periodo diurno i livelli sono in genere più alti,

sia durante il periodo con riscaldamenti accesi che con riscaldamenti spenti. Tale differenza è risultata statisticamente significativa (test di Wilcoxon) ad eccezione della frazione fine con diametro aerodinamico compreso tra 0.3 e 0.5  $\mu\text{m}$  nel periodo invernale.

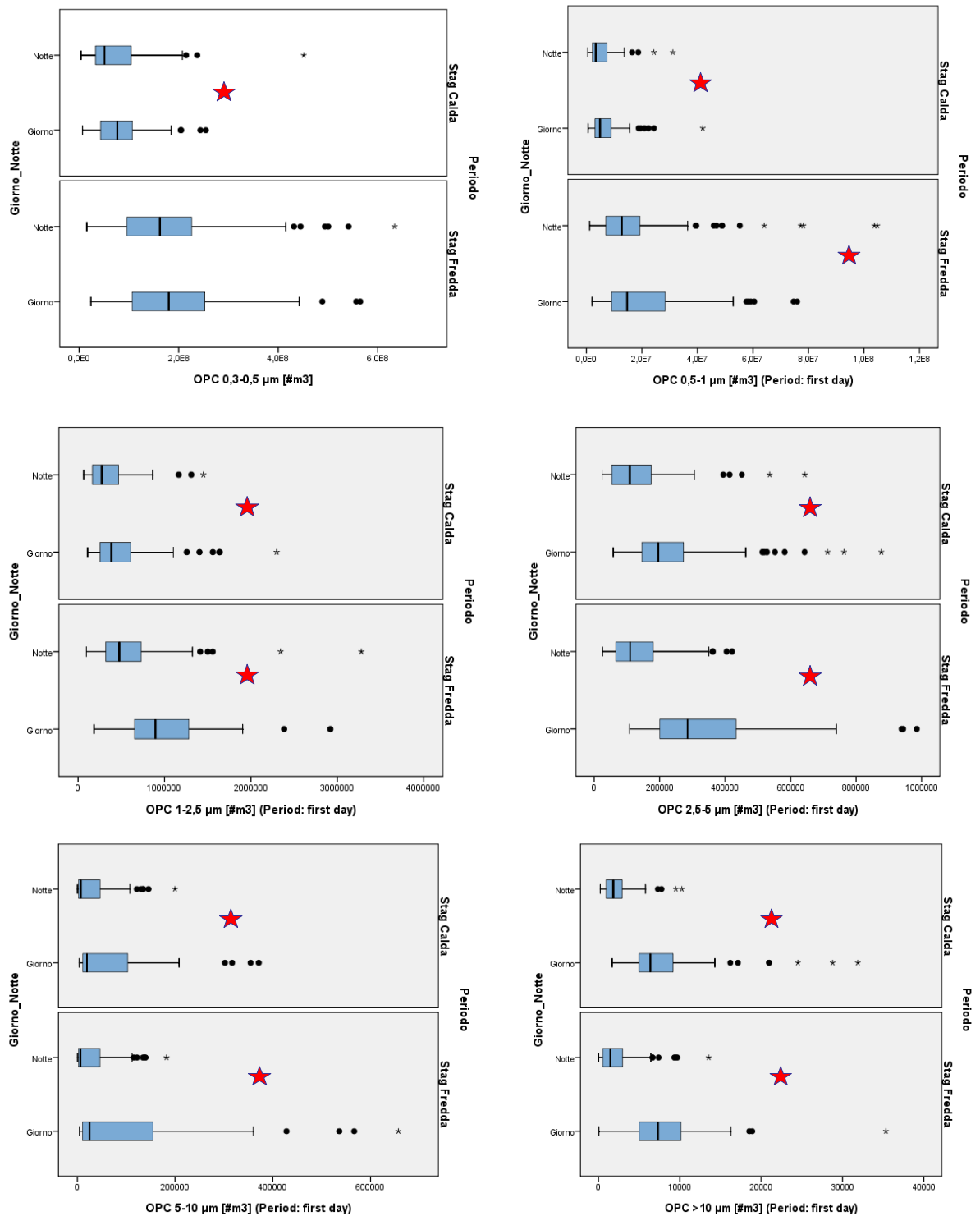


Fig 3.2 Box plot delle concentrazioni numeriche medie individuali nel giorno e nella notte dei due periodi di monitoraggio (Stagione calda e Stagione fredda) dei soggetti del progetto PM-CARE. L'asterisco indica una differenza significativa (Wilcoxon test) tra le concentrazioni diurne e notturne.

### 3.1.3 Variazione dell'esposizione tra i gruppi di soggetti

Al fine di meglio comprendere i risultati dello studio dell'associazione tra particolato ed effetti sulla salute dei volontari partecipanti al progetto, si è ritenuto di interesse la valutazione dei livelli medi di esposizione nei tre diversi gruppi ("Sani", Cardio e Penumo) al fine di individuare eventuali eterogeneità nei livelli di esposizione. È stata pertanto testata un'eventuale differenza di esposizione, attraverso l'applicazione dell'ANOVA per misure ripetute sui parametri ambientali log-trasformati (al fine di ottenere la normalità della distribuzione). I risultati sono mostrati in tabella 3.2.

Parametri ambientali		Confronto fra gruppi	"Sani"	Cardio	Pneumo
		R A	Mediana 25°-75°	Mediana 25°-75°	Mediana 25°-75°
Concentrazione di massa [µg/m³]	PM 0.5	**	31,3 19,8-50,3	28,1 18,1-37,1	20,6 15,3-41,7
	PM 1	*	35,5 23,0-53,3	31,4 20,1-40,3	23,5 17,8-46,8
	PM 2.5	*	40,0 27,2-57,9	35,7 25,2-46,1	29,0 20,7-50,4
	PM 10	*	50,3 35,4-69,7	48,3 34,8-59,8	38,5 27,5-60,1
Concentrazione numerica [#/cm³]	UFP [0.02-1µm]		19441 15269-28912	19545 13898-30739	19084 14139-30515
	FP [0.3-0.5µm]	**	149,2 74,9 - 223,5	100,8 67,8 - 156,9	63,8 42,3- 175,3
	FP [0.5-1.0 µm]	**	13,2 5,6 - 20,3	8,9 4,7 -12,8	5,1 3,0- 19,3
	FP [1.0-2.5 µm]		0,526 0,357-0,915	0,595 0,382- 0,875	0,444 0,263-0,808
	CP [2.5-5.0µm]		0,220 0,155- 0,305	0,205 0,142- 0,351	0,192 0,138- 0,294
	CP [5-10µm]		0,019 0,012- 0,130	0,014 0,009- 0,103	0,015 0,008- 0,121
	CP [>10µm]		0,006 0,005- 0,008	0,006 0,004- 0,008	0,007 0,005- 0,009
Parametri microclimatici	Temperatura [C°]		25,3 23,1-28,5	25,2 22,7-28,9	25,4 23,1-28,3
	Umidità Relativa [%]	**	39,7 34,1-44,2	38,2 34,3-43,7	34,6 31,6-40,4

**Tab. 3.2 Mediana, 25° e 75°percentile delle concentrazioni individuali, numeriche e gravimetriche, di particolato urbano, nonché dei parametri microclimatici, per i tre gruppi di soggetti partecipanti al progetto PM-CARE ("Sani", Cardiopatici, Pneumopatici). La differenza tra i livelli di esposizione nei tre gruppi è stata testata mediante ANOVA per misure ripetute sul logaritmi dei parametri ambientali. Sono state riportate le significatività con  $p < 0.05$  (\*\*) e con  $p < 0.1$  (\*).**



I risultati dimostrano che esiste effettivamente una differenza tra i livelli di esposizione dei tre gruppi. In particolare gli pneumopatici sono stati soggetti a livelli più bassi di inquinamento da particolato rispetto agli altri due gruppi, mentre i sani tendenzialmente ai livelli maggiori. Tale differenza in esposizione è risultata statisticamente significativa per la frazione di particolato con range di diametro aerodinamico 0.3-1  $\mu\text{m}$ .

### **3.1.4 Discussioni dei risultati ambientali**

Il superamento dei livelli di particolato indicati dalle Linee Guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, sia in estate che in inverno per il PM<sub>2.5</sub>, e in inverno per il PM<sub>10</sub>, è indicativo della scarsa qualità dell'aria nelle zone monitorate. La pianura Padana, infatti, ha una conformazione geologica tale da favorire l'accumulo del particolato, a causa della barriera naturale dell'arco alpino e degli Appennini, che la proteggono dai venti e rendendo meno probabile la diluizione del particolato negli strati più alti dell'atmosfera. Altro fattore da non sottovalutare, inoltre, è legato al fatto che la quasi totalità dei soggetti era residente in aree estremamente urbanizzate (ovvero a Milano e a Monza), pertanto il contributo del traffico veicolare ai livelli di particolato è stato verosimilmente molto elevato. Questo giustificherebbe anche il fatto che la frazione predominante che costituisce l'intero PM<sub>10</sub> è costituita dalle particelle con diametro inferiore a 0.5  $\mu\text{m}$ , ovvero nel range della moda di accumulazione. In essa infatti confluiscono da una parte le particelle ultrafini, che a seguito di processi di condensazione e nucleazione si accorpano a formare particelle più grosse, dall'altra le particelle grossolane, che per le loro dimensioni tendono spontaneamente a spezzarsi in particelle di dimensioni inferiori.

Altro aspetto interessante, emerso dalle analisi descrittive dell'esposizione dei soggetti in studio, è stato l'andamento stagionale dei livelli di particolato. I livelli invernali, nettamente maggiori rispetto a quelli estivi, risentono del contributo da una parte della sorgente di emissione legata ai riscaldamenti domestici in funzione, dall'altra dell'abbassamento dello strato di rimescolamento atmosferico, con conseguente diminuzione della diluizione del particolato nell'aria. In questo modo è possibile spiegare il drastico aumento delle particelle appartenenti alla moda di accumulazione (FP 0.3-1 $\mu\text{m}$ ). Discorso diverso va fatto invece per il particolato grossolano (CP 5-10  $\mu\text{m}$ ), la cui origine è legata a processi di tipo meccanico o di

tipo naturale, pertanto indipendenti da fenomeni di tipo stagionale. Ciò spiegherebbe la mancanza di differenza significativa tra monitoraggio invernale ed estivo.

Il fenomeno per cui i livelli di particolato sono risultati tendenzialmente maggiori durante l'esposizione diurna rispetto all'esposizione notturna, senza distinzione tra estate e inverno, potrebbe essere riconducibile alle attività svolte durante la giornata. Infatti, le attività indoor contribuiscono in modo diverso all'innalzamento dei livelli di particolato delle varie frazioni, in base al tipo di sorgente chiamato in causa (*Abt* 2000, *Liu* 1995, *Kousa* 2001). Si può considerare, a titolo di esempio, l'attività di cucina, che contribuisce notevolmente all'innalzamento dei livelli di particelle ultrafini (processi di combustione), così come all'apertura delle finestre, che favorisce l'ingresso del particolato outdoor, o ancora alle pulizie domestiche, che generano il risollevarsi delle particelle più grossolane. Durante il giorno, inoltre, i soggetti hanno effettuato dei percorsi outdoor, con relativo innalzamento dei valori di particolato dovuto al traffico veicolare.

Ultimo aspetto considerato, infine, è la differenza di livelli di esposizione a particelle appartenenti al range 0.3-1  $\mu\text{m}$  che è stata riscontrata per i tre gruppi di soggetti. Questo aspetto può essere dovuto alla maggiore predisposizione dei soggetti appartenenti al gruppo "Sani" ad effettuare attività al di fuori delle mura domestiche e pertanto ad essere esposti alla frazione di particolato caratteristica dell'inquinamento outdoor relativa al traffico veicolare. D'altro canto giustificerebbe invece la comparabilità dei livelli per la frazione ultrafine, associata a sorgenti di tipo prevalentemente indoor. Questa differenza di esposizione è comunque da tenere presente nell'interpretazione dei risultati di associazione tra esposizione a particolato ed effetti clinici, e andrebbe approfondita alla luce delle attività svolte dai soggetti nelle ore del monitoraggio.

### **3.2 Descrizione della popolazione studiata**

In totale sono stati esaminati 112 soggetti, di cui 16 non hanno soddisfatto i criteri di selezione e 5 non hanno accettato il protocollo di indagine. In totale hanno completato l'intero protocollo estivo-invernale 81 soggetti: 34 del gruppo "Cardio", 20 del gruppo "Pneumo" e 27 del gruppo "Sani".

L'età media ( $\pm$  DS) dei soggetti è di 66 ( $\pm$  10) anni nel Gruppo Cardio, 65 ( $\pm$  11) nel Gruppo Pneumo e 61 ( $\pm$  6) nel Gruppo "Sani". Il sesso maschile è prevalente nel Gruppo Cardio (88%), mentre negli altri due gruppi la percentuale dei due sessi è

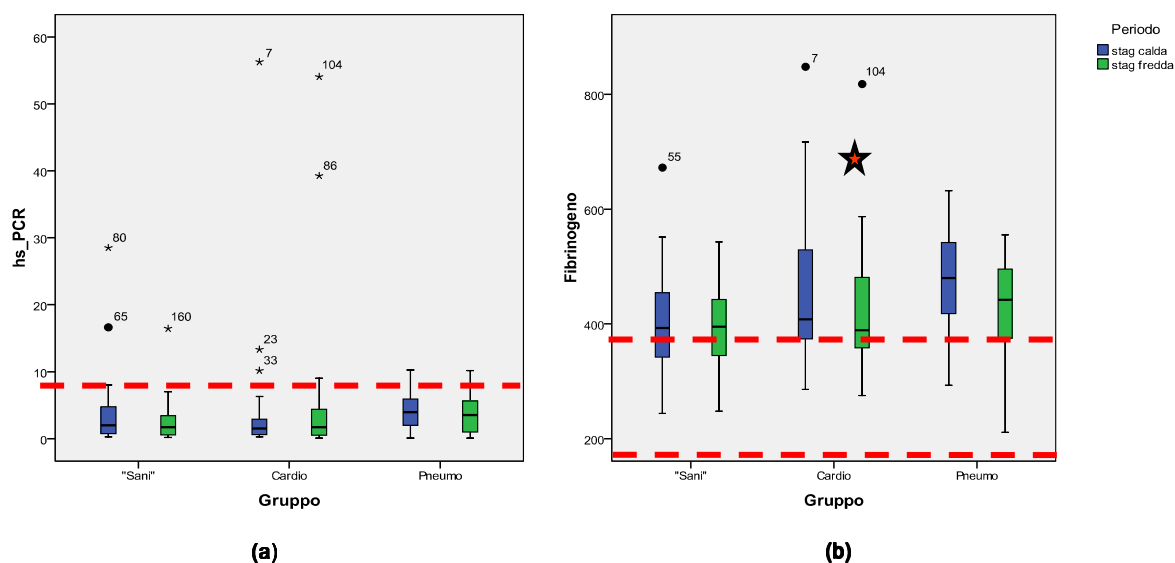
sovrapponibile. I soggetti hanno mantenuto invariata la terapia per quanto possibile; di seguito si segnalano le terapie croniche di maggior rilievo: antiaggreganti piastrinici (Cardio 100% - Pneumo 5% - “Sani” 4%), antinfiammatori non steroidei (Cardio 3% - Pneumo 35% - “Sani” 0%), altri antinfiammatori (Cardio 6% - Pneumo 43% - “Sani” 2%). Qualsiasi studio statistico dei parametri clinici dovrà tenere conto di queste variabili che potrebbero influire nel comportamento del parametro e fungere da confondenti nelle misure di associazione tra PM e variabile clinica.

### **3.3 Analisi degli indici di infiammazione e coagulazione**

L'andamento dell'indice di infiammazione selezionato, cioè la proteina C-Reattiva (hs-PCR), nel campione in studio risulta in media entro valori normali. E' possibile evidenziare che il livello di infiammazione del gruppo di soggetti pneumopatici è maggiore rispetto a quello degli altri gruppi, sebbene tale differenza non sia risultata statisticamente significativa. Inoltre, la differenza tra l'andamento del parametro nel periodo caldo rispetto al periodo freddo non è risultata statisticamente significativa per nessuno dei tre gruppi.

Per quanto riguarda l'andamento del fibrinogeno, indice dello stato coagulatorio della componente ematica dei soggetti, si è verificata una differenza statisticamente significativa fra gruppi con valori più alti nel campione degli pneumopatici, probabilmente a causa della patologia, che li rende soggetti ad un'infiammazione di tipo cronico. La variazione del parametro in base al periodo di monitoraggio risulta statisticamente significativa per il gruppo dei cardiopatici e non significativa ma comunque presente nel gruppo degli pneumopatici, mentre i “sani” risultano il gruppo meno sensibile al processo infiammatorio. Tale andamento da un lato rispecchia il ritmo stagionale del parametro, dall'altro suggerisce una relazione con l'aumento invernale di PM.

Una descrizione dell'andamento dei due parametri, sia rispetto al gruppo che al periodo di monitoraggio, è mostrata nelle figure 3.3 (a-b) mediante box-plot.



**Fig 3.3 (a-b) Box plot di hs\_PCR e Fibrinogeno per i soggetti del progetto PM-CARE suddivisi per gruppo ("Sani", Cardio e Pneumo) e per periodo di monitoraggio (Stagione calda e Stagione fredda). L'asterisco indica una differenza significativa (t-test) tra i due monitoraggi.**

### 3.3.1 Studio dell'associazione tra particolato atmosferico e indici dell'infiammazione e della coagulazione

I parametri ematochimici studiati sono disponibili come misura di fine monitoraggio. Come anticipato (par. 2.3.2), i modelli lineari misti per misure ripetute sono stati applicati a tre scenari: quello dell'esposizione delle 24 ore del monitoraggio, quello dell'esposizione del periodo di veglia dei soggetti e quello del loro periodo di riposo notturno (per le misure in continuo).

Le variabili indipendenti, aggiunte al modello in quanto confondenti e/o modificatori d'effetto, sono state, oltre ai parametri microclimatici (temperatura e umidità relativa): gruppo, genere, età e Body-Mass-Index, nonché l'assunzione di farmaci antinfiammatori, che hanno un effetto sul parametro in studio.

Sono stati testati ma esclusi dal modello, in quanto non associati alla variabile dipendente, le statine e il termine di interazione PM\*Gruppo.

I risultati dei modelli, di cui riportiamo il coefficiente di regressione, l'intervallo di confidenza al 95% e la significatività dell'associazione per le diverse frazioni di particolato, sono descritti nelle tabelle 3.3 (a-b-c).

hs-PCR – Fine Monitoraggio					
Parametri ambientali Media 24 ore		Coefficiente di regressione	Intervallo di confidenza al 95%		p-value
			Limite inferiore	Limite superiore	
Concentrazione di massa [µg/m³]	PM 0.5	$-0.301 \cdot 10^{-3}$	-0.013	0.007	0.557
	PM 1	-0.003	-0.012	0.006	0.509
	PM 2.5	-0.003	-0.011	0.006	0.511
	PM 10	-0.003	-0.010	0.005	0.488
Concentrazione numerica [#/cm³]	UFP [0.02-1µm]	$-0.002 \cdot 10^{-3}$	$-0.019 \cdot 10^{-3}$	$0.016 \cdot 10^{-3}$	0.830
	FP [0.3-0.5µm]	$-0.391 \cdot 10^{-3}$	-0.002	0.001	0.662
	FP [0.5-1.0 µm]	-0.003	-0.015	0.010	0.682
	FP [1.0-2.5 µm]	-0.280	-0.652	0.091	0.138
	CP [2.5-5.0µm]	-0.068	-1.256	1.121	0.910
	CP [5-10µm]	1.477	-0.324	3.278	0.107
	CP [>10µm]	-14.060	-54.087	25.968	0.488

(a)

hs-PCR – Fine Monitoraggio					
Parametri ambientali Media Giorno		Coefficiente di regressione	Intervallo di confidenza al 95%		p-value
			Limite inferiore	Limite superiore	
Concentrazione numerica [#/cm³]	UFP [0.02-1µm]	$-0.001 \cdot 10^{-3}$	$-0.018 \cdot 10^{-3}$	$0.016 \cdot 10^{-3}$	0.881
	FP [0.3-0.5µm]	$-0.395 \cdot 10^{-3}$	-0.002	0.001	0.650
	FP [0.5-1.0 µm]	-0.004	-0.015	0.010	0.714
	FP [1.0-2.5 µm]	-0.212	-0.524	0.101	0.182
	CP [2.5-5.0µm]	-0.089	-0.972	0.793	0.841
	CP [5-10µm]	1.038	-0.367	2.444	0.146
	CP [>10µm]	-8.536	-38.137	21.064	0.569

(b)

hs-PCR – Fine Monitoraggio					
Parametri ambientali Notte		Coefficiente di regressione	Intervallo di confidenza al 95%		p-value
			Limite inferiore	Limite superiore	
Concentrazione numerica [#/cm <sup>3</sup> ]	FP [0.3-0.5µm]	-0.516 · 10 <sup>-3</sup>	-0.002	0.001	0.504
	FP [0.5-1.0 µm]	-0.003	-0.014	0.007	0.543
	FP [1.0-2.5 µm]	-0.271	-0.640	0.099	0.149
	CP [2.5-5.0µm]	0.597	-0.998	2.192	0.460
	CP [5-10µm]	3.779	0.149	7.408	0.041
	CP [>10µm]	-14.214	-90.391	61.964	0.713

(c)

**Tabella 3.3 (a-b-c) Risultati dei modelli lineari misti per la proteina C-reattiva nello studio dell'associazione all'esposizione a particolato nelle 24 ore del monitoraggio (a), nel periodo di veglia (b) e di riposo notturno (c) per i soggetti del progetto PM-CARE. Oltre al particolato, le variabili indipendenti incluse nei modelli sono: temperatura, umidità relativa, gruppo, genere, età, Body-Mass-Index, farmaci antinfiammatori. I soggetti sono stati considerati come effetti random del modello.**

L'effetto dell'esposizione a particolato sulla proteina C-reattiva risulta apprezzabile per la frazione di particolato con diametro aerodinamico compreso tra 5 e 10 µm, in termini di concentrazione numerica di particelle. Tale associazione risulta statisticamente significativa soltanto nel caso della media delle concentrazioni relative al periodo notturno. Il tipo di associazione è positivo, cioè un incremento delle concentrazioni di particolato determina un incremento dell'indice di infiammazione sistemica; l'incremento è maggiore per l'esposizione del periodo notturno, come si può dedurre dal valore del coefficiente di regressione.

I confondenti inclusi nei modelli lineari misti utilizzati per individuare l'associazione del *fibrinogeno* con le diverse frazioni del PM sono, oltre a temperatura e umidità relativa: genere, gruppo, età e l'assunzione di farmaci antiaggreganti (incluso l'acido acetilsalilico), di antinfiammatori non steroidei e di statine. Sono stati inizialmente inseriti nel modello il Body-Mass-Index e l'interazione PM\*gruppo ma in nessun caso sono risultati significativamente associati.

I risultati dei modelli, di cui riportiamo il coefficiente di regressione, l'intervallo di confidenza al 95% e la significatività dell'associazione per le diverse frazioni di particolato, sono descritti nelle tabelle 3.4 (a-b-c).

Fibrinogeno – Fine Monitoraggio					
Parametri ambientali Media 24 ore		Coefficiente di regressione	Intervallo di confidenza al 95%		p-value
			Limite inferiore	Limite superiore	
Concentrazione di massa [ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ]	PM 0.5	0.029	-0.828	0.885	0.947
	PM 1	0.085	-0.677	0.846	0.826
	PM 2.5	0.075	-0.652	0.802	0.839
	PM 10	0.106	-0.565	0.778	0.754
Concentrazione numerica [ $\#/\text{cm}^3$ ]	UFP [0.02-1 $\mu\text{m}$ ]	$0.034 \cdot 10^{-3}$	-0.001	0.002	0.963
	FP [0.3-0.5 $\mu\text{m}$ ]	0.001	-0.1439	0.146	0.988
	FP [0.5-1.0 $\mu\text{m}$ ]	0.048	-0.963	1.058723	0.926
	FP [1.0-2.5 $\mu\text{m}$ ]	-19.366	-52.288	13.557	0.246
	CP [2.5-5.0 $\mu\text{m}$ ]	74.277	-33.649	182.203	0.176
	CP [5-10 $\mu\text{m}$ ]	175.719	24.646	326.792	0.023
	CP [ >10 $\mu\text{m}$ ]	-485.092	-4041.33	3071.142	0.788

(a)

Fibrinogeno – Fine Monitoraggio					
Parametri ambientali Media Giorno		Coefficiente di regressione	Intervallo di confidenza al 95%		p-value
			Limite inferiore	Limite superiore	
Concentrazione numerica [ $\#/\text{cm}^3$ ]	UFP [0.02-1 $\mu\text{m}$ ]	$0.012 \cdot 10^{-3}$	-0.001	0.001	0.986
	FP [0.3-0.5 $\mu\text{m}$ ]	0.005	-0.135	0.144	0.949
	FP [0.5-1.0 $\mu\text{m}$ ]	0.125	-0.876	1.127	0.804
	FP [1.0-2.5 $\mu\text{m}$ ]	-15.067	-42.674	12.541	0.282
	CP [2.5-5.0 $\mu\text{m}$ ]	57.489	-21.746	136.723	0.153
	CP [5-10 $\mu\text{m}$ ]	138.592	22.470	254.715	0.020
	CP [ >10 $\mu\text{m}$ ]	186.113	-2471.892	2844.117	0.890

(b)

Fibrinogeno – Fine Monitoraggio					
Parametri ambientali Media Notte		Coefficiente di regressione	Intervallo di confidenza al 95%		p-value
			Limite inferiore	Limite superiore	
Concentrazione numerica [#/cm <sup>3</sup> ]	FP [0.3-0.5µm]	-0.014	-0.142	0.115	0.834
	FP [0.5-1.0 µm]	-0.041	-0.881	0.799	0.923
	FP [1.0-2.5 µm]	-15.249	-47.449	16.951	0.350
	CP [2.5-5.0µm]	124.226	-21.882	270.333	0.095
	CP [5-10µm]	342.966	15.544	670.388	0.040
	CP [>10µm]	81.235	-6165.938	6328.408	0.980

(c)

**Tabella 3.4 (a-b-c) Risultati dei modelli lineari misti per il Fibrinogeno nello studio dell'associazione con l'esposizione a particolato nelle 24 ore del monitoraggio (a), nel periodo di veglia (b) e di riposo notturno (c) per i soggetti del progetto PM-CARE. Oltre al particolato, le variabili indipendenti incluse nei modelli sono: temperatura, umidità relativa, genere, gruppo, età, farmaci antiaggreganti, antinfiammatori non steroidei e statine. I soggetti sono stati considerati come effetti random del modello.**

I risultati dei modelli lineari misti per misure ripetute evidenziano un effetto sul fibrinogeno legato alla concentrazione numerica delle particelle con diametro aerodinamico compreso tra 5 e 10 µm. L'associazione risulta statisticamente significativa in tutti e tre gli scenari espositivi, cioè rispetto all'esposizione media delle 24 ore di monitoraggio, del periodo diurno e del periodo notturno.

Il tipo di associazione è positivo, quindi un incremento delle concentrazioni di particolato determina un incremento dell'indice di coagulazione sanguigna. L'incremento risulta maggiore per l'esposizione notturna, come si può dedurre dal valore del coefficiente di regressione.

### 3.3.2 Discussione dei risultati per gli indicatori di infiammazione e coagulazione

La presenza di un effetto della frazione grossolana di particolato (CP [5-10µm]) sull'aumento sia della proteina C-reattiva che del fibrinogeno, suggerisce che la fonte di esposizione principale sia di tipo prevalentemente outdoor, legata quindi alla presenza di polveri grossolane di origine naturale o antropica e dalla loro infiltrazione dentro le casa.



Da un punto di vista clinico, l'effetto del particolato appartenente a questa frazione dimensionale può essere spiegato dalla presenza, in essa, di endotossine batteriche, oltre che di pollini e spore, che stimolerebbero da una parte le reazioni immunitarie contro i batteri, dall'altra delle reazioni di tipo allergico.

La relazione positiva tra particolato e questi due parametri clinici conferma l'ipotesi per cui l'azione del particolato della frazione grossolana indurrebbe un'inflammatione dapprima locale, cioè a carico dei polmoni, quindi sistemica, stimolando la produzione di proteine di fase acuta da parte del fegato, tra cui quelle da noi studiate.

L'effetto del particolato grossolano sull'inflammatione sistemica, testimoniata dall'incremento della hs-PCR, contribuirebbe quindi a mantenere uno stato infiammatorio in tutto l'organismo, a cui è stato associato un danno tissutale e un incremento di rischio di eventi coronarici acuti, coerentemente con quanto riportato in letteratura (*Salvi 1999, Ghio 2000, Ghio A.J. 2000b, Ghio 2001, Fujii 2001, van Eeden 2001, Suwa 2002, Becker 2003, Brown 2004, Gonzalez-Flecha 2004, Bai 2007*).

Per quanto riguarda l'aumento del fibrinogeno in associazione all'esposizione a particolato grossolano, invece, esso favorirebbe la formazione di nuovi trombi o una destabilizzazione delle placche ateromatose preesistenti, come già indicato da altri studi (*Peters 1997, Ghio 2003, Nemmar et al 2003; Gilmour 2005, Carlsten 2007, Ruckler 2007*).

Sia per l'indice di inflammatione che di coagulazione sanguigna, inoltre, l'associazione è risultata più forte nel caso dell'esposizione notturna. Questo suggerirebbe la mancanza di un tempo di latenza tra esposizione a particolato ed effetto clinico sui parametri studiati.

### **3.4 Analisi degli indici della variabilità cardiaca**

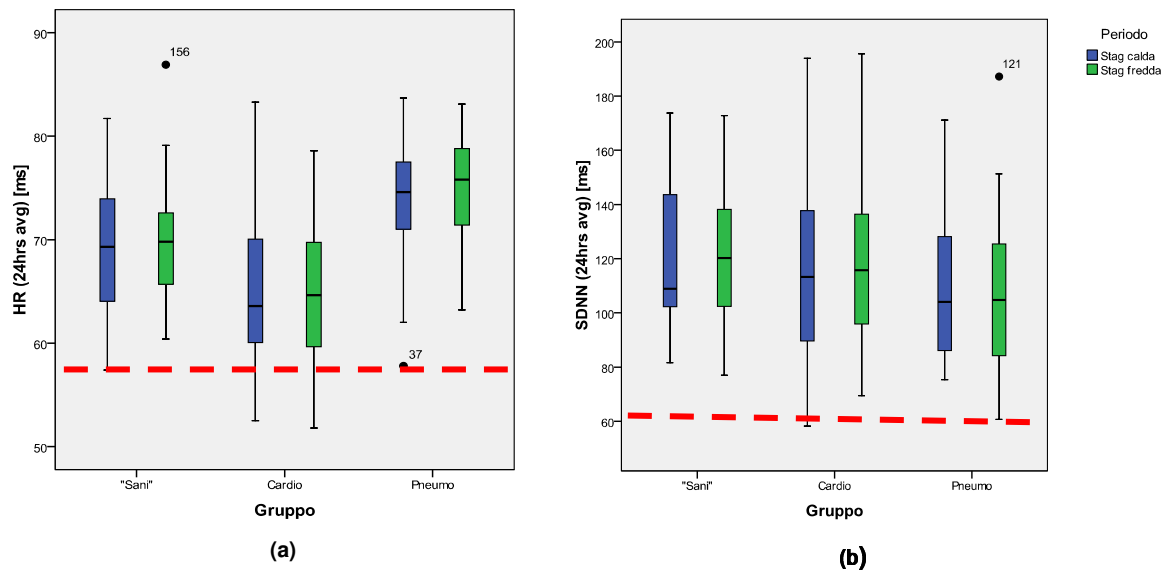
Di seguito si riportano graficamente le analisi descrittive dei due parametri studiati relativi alla variabilità della frequenza cardiaca (HRV), cioè frequenza cardiaca e SDNN.

La maggior parte dei soggetti ha presentato valori medi di frequenza cardiaca nel range di normalità. I cardiopatici hanno presentato valori significativamente più

bassi, verosimilmente dovuti all'assunzione di farmacoterapia, come betabloccanti e antiaritmici.

Per quanto riguarda la SDNN, i valori medi ottenuti sono risultati entro i limiti di riferimento e non si riscontra una differenza tra gruppi statisticamente significativa.

Una descrizione dell'andamento dei due parametri, sia rispetto al gruppo che al periodo di monitoraggio, è mostrata nelle figure 3.4 (a-b) mediante box-plot.



**Fig 3.4 (a-b) Box plot della Frequenza Cardiaca (a) e della SDNN (b) per i soggetti del progetto PM-CARE suddivisi per gruppo ("Sani", Cardio e Pneumo) e per periodo di monitoraggio (Stagione calda e Stagione fredda).**

### 3.4.1 Studio dell'associazione tra particolato atmosferico e indici della variabilità cardiaca

Come già precedentemente descritto (par. 2.3.2), dato che la frequenza cardiaca e la SDNN sono stati registrati in continuo, è stato possibile applicare i modelli a quattro tipi di scenari: (a) esposizione media delle 24 ore rispetto a FC/SDNN mediate sulle 24 ore, (b) esposizione media delle ore di veglia del soggetto rispetto a FC/SDNN mediate sullo stesso periodo, (c) esposizione media delle ore di veglia del soggetto rispetto a FC/SDNN mediate sulle ore di riposo notturno, (d) esposizione media delle ore di riposo notturno del soggetto rispetto a FC/SDNN mediate sullo stesso periodo.

I confondenti clinici inseriti nel modello lineare misto per misure ripetute sono gli stessi sia per la frequenza cardiaca che per la SDNN, in quanto i due parametri sono entrambi associati al funzionamento dell'organo cuore. Essi sono: genere, gruppo, età, Body-Mass-Index, hs-PCR (come caratteristiche antropometriche), betabloccanti, diuretici, ACE-inibitori e calcio antagonisti (come farmacoterapia), nonché l'eventuale assunzione di bevande alcoliche. Sono stati esclusi dai modelli le statine e l'interazione del particolato con il gruppo in quanto non sono risultate associate alla variabile dipendente.

FC – Media 24 h					
Parametri ambientali Media 24 h		Coefficiente di regressione	Intervallo di confidenza al 95%		p-value
			Limite inferiore	Limite superiore	
Concentrazione di massa [ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ]	PM 0.5	0.031	-0.018	0.081	0.209
	PM 1	0.030	-0.014	0.073	0.181
	PM 2.5	0.026	-0.015	0.068	0.213
	PM 10	0.020	-0.018	0.058	0.299
Concentrazione numerica [ $\#/\text{cm}^3$ ]	UFP [0.02-1 $\mu\text{m}$ ]	$-0.021 \cdot 10^{-3}$	$-0.099 \cdot 10^{-3}$	$0.057 \cdot 10^{-3}$	0.597
	FP [0.3-0.5 $\mu\text{m}$ ]	0.009	0.001	0.016	0.037
	FP [0.5-1.0 $\mu\text{m}$ ]	0.062	0.004	0.120	0.037
	FP [1.0-2.5 $\mu\text{m}$ ]	0.061	-1.913	2.035	0.951
	CP [2.5-5.0 $\mu\text{m}$ ]	-1.941	-8.035	4.153	0.528
	CP [5-10 $\mu\text{m}$ ]	-2.780	-11.963	6.404	0.549
	CP [>10 $\mu\text{m}$ ]	-47.426	-249.755	154.904	0.642

(a)

FC – Media Giorno					
Parametri ambientali Media Giorno		Coefficiente di regressione	Intervallo di confidenza al 95%		p-value
			Limite inferiore	Limite superiore	
Concentrazione numerica [#/cm <sup>3</sup> ]	UFP [0.02-1µm]	-0.002 · 10 <sup>-3</sup>	-0.082 · 10 <sup>-3</sup>	0.077 · 10 <sup>-3</sup>	0.955
	FP [0.3-0.5µm]	0.011	0.003	0.018	0.005
	FP [0.5-1.0 µm]	0.073	0.019	0.127	0.009
	FP [1.0-2.5 µm]	1.315	-0.291	2.922	0.107
	CP [2.5-5.0µm]	2.949	-1.187	7.085	0.160
	CP [5-10µm]	2.718	-3.902	9.338	0.416
	CP [>10µm]	34.482	-110.797	179.760	0.638

(b)

FC – Media Notte					
Parametri ambientali Media Giorno		Coefficiente di regressione	Intervallo di confidenza al 95%		p-value
			Limite inferiore	Limite superiore	
Concentrazione numerica [#/cm <sup>3</sup> ]	UFP [0.02-1µm]	-0.013 · 10 <sup>-3</sup>	-0.088 · 10 <sup>-3</sup>	0.061 · 10 <sup>-3</sup>	0.725
	FP [0.3-0.5µm]	0.004	-0.003	0.011	0.275
	FP [0.5-1.0 µm]	0.022	-0.032	0.075	0.423
	FP [1.0-2.5 µm]	-0.838	-2.232	0.557	0.236
	CP [2.5-5.0µm]	0.042	-3.918	4.002	0.983
	CP [5-10µm]	2.876	-3.346	9.098	0.361
	CP [>10µm]	-76.679	-213.530	60.173	0.269

(c)

FC – Media Notte					
Parametri ambientali Media Notte		Coefficiente di regressione	Intervallo di confidenza al 95%		p-value
			Limite inferiore	Limite superiore	
Concentrazione numerica [#/cm <sup>3</sup> ]	FP [0.3-0.5µm]	0.003	-0.004	0.010	0.337
	FP [0.5-1.0 µm]	0.015	-0.034	0.064	0.534
	FP [1.0-2.5 µm]	-0.626	-2.414	1.162	0.489
	CP [2.5-5.0µm]	0.777	-6.781	8.335	0.839
	CP [5-10µm]	8.113	-9.130	25.356	0.353
	CP [>10µm]	-195.631	-545.879	154.616	0.271

(d)

**Tabella 3.5 (a-b-c-d) Risultati dei modelli lineari misti per la frequenza cardiaca (FC) per lo studio dell'associazione tra: esposizione a particolato mediata sulle 24 ore del monitoraggio rispetto a FC mediata sulle 24 ore (a), esposizione mediata sulle ore di veglia del soggetto rispetto a FC mediata sullo stesso periodo (b), esposizione media delle ore di veglia del soggetto rispetto a FC mediata sulle ore di riposo notturno (c), esposizione media delle ore di riposo notturno del soggetto rispetto a FC mediata sullo stesso periodo (d). Oltre al particolato, le variabili indipendenti incluse nei modelli sono: temperatura, umidità relativa, genere, gruppo, età, Body-Mass-Index, hs-PCR, betabloccanti, diuretici, ACE-inibitori e calcio antagonisti, abitudine all'alcol. I soggetti sono stati considerati come effetti random del modello.**

I risultati dei modelli lineari misti per misure ripetute mostrano un effetto sulla frequenza cardiaca, legato alla concentrazione numerica delle particelle con diametro aerodinamico compreso tra 0.3 e 1 µm. L'associazione risulta statisticamente significativa sia nel caso della media delle 24 ore di entrambi i monitoraggi, che nel caso della media delle ore di veglia del soggetto per entrambi i monitoraggi. In tutti e due i casi, il tipo di associazione è positivo, quindi un incremento delle concentrazioni di particolato determina un incremento della frequenza cardiaca.

Di seguito riportiamo i risultati dei modelli lineari misti per misure ripetute nel caso della SDNN.

SDNN – Media 24 h					
Parametri ambientali Media 24 h		Coefficiente di regressione	Intervallo di confidenza al 95%		p-value
			Limite inferiore	Limite superiore	
Concentrazione di massa [µg/m³]	PM 0.5	0.047	-0.173	0.266	0.673
	PM 1	0.035	-0.161	0.232	0.722
	PM 2.5	0.040	-0.147	0.227	0.672
	PM 10	0.039	-0.131	0.208	0.652
Concentrazione numerica [#/cm³]	UFP [0.02-1µm]	$0.066 \cdot 10^{-3}$	$-0.280 \cdot 10^{-3}$	$0.413 \cdot 10^{-3}$	0.705
	FP [0.3-0.5µm]	-0.009	-0.047	0.029	0.624
	FP [0.5-1.0 µm]	-0.024	-0.305	0.258	0.867
	FP [1.0-2.5 µm]	1.964	-6.734	10.661	0.654
	CP [2.5-5.0µm]	5.626	-20.967	32.219	0.675
	CP [5-10µm]	2.160	-38.945	43.266	0.917
	CP [ >10µm]	70.561	-833.738	974.859	0.877

(a)

SDNN – Media Giorno					
Parametri ambientali Media Giorno		Coefficiente di regressione	Intervallo di confidenza al 95%		p-value
			Limite inferiore	Limite superiore	
Concentrazione numerica [#/cm³]	UFP [0.02-1µm]	$-0.079 \cdot 10^{-3}$	$-0.409 \cdot 10^{-3}$	$0.250 \cdot 10^{-3}$	0.633
	FP [0.3-0.5µm]	-0.013	-0.046	0.019	0.417
	FP [0.5-1.0 µm]	-0.074	-0.317	0.168	0.542
	FP [1.0-2.5 µm]	-3.760	-10.390	2.869	0.263
	CP [2.5-5.0µm]	-2.407	-19.550	14.736	0.781
	CP [5-10µm]	6.236	-22.175	34.647	0.664
	CP [ >10µm]	-29.106	-601.135	542.923	0.920

(b)

SDNN – Media Notte					
Parametri ambientali Media Giorno		Coefficiente di regressione	Intervallo di confidenza al 95%		p-value
			Limite inferiore	Limite superiore	
Concentrazione numerica [#/cm <sup>3</sup> ]	UFP [0.02-1µm]	-0.046 · 10 <sup>-3</sup>	-0.421 · 10 <sup>-3</sup>	0.325 · 10 <sup>-3</sup>	0.797
	FP [0.3-0.5µm]	-0.053	-0.089	-0.018	0.004
	FP [0.5-1.0 µm]	-0.355	-0.623	-0.087	0.010
	FP [1.0-2.5 µm]	-2.932	-9.697	3.834	0.391
	CP [2.5-5.0µm]	-7.816	-27.140	11.508	0.424
	CP [5-10µm]	-6.013	-37.756	25.729	0.708
	CP [>10µm]	-124.164	-771.771	523.443	0.704

(c)

SDNN – Media notte					
Parametri ambientali Media Notte		Coefficiente di regressione	Intervallo di confidenza al 95%		p-value
			Limite inferiore	Limite superiore	
Concentrazione numerica [#/cm <sup>3</sup> ]	FP [0.3-0.5µm]	-0.037	-0.071	-0.003	0.033
	FP [0.5-1.0 µm]	-0.223	-0.468	0.014	0.051
	FP [1.0-2.5 µm]	-1.700	-10.587	7.188	0.705
	CP [2.5-5.0µm]	4.138	-30.656	38.932	0.814
	CP [5-10µm]	8.860	-73.046	90.766	0.830
	CP [>10µm]	345.160	-1390.415	2080.735	0.694

(d)

**Tabella 3.6 (a-b-c-d) Risultati dei modelli lineari misti per la SDNN per lo studio dell'associazione tra: esposizione a particolato mediata sulle 24 ore del monitoraggio rispetto a SDNN mediata sulle 24 ore (a), esposizione mediata sulle ore di veglia del soggetto rispetto a SDNN mediata sullo stesso periodo (b), esposizione media delle ore di veglia del soggetto rispetto a SDNN mediata sulle ore di riposo notturno (c), esposizione media delle ore di riposo notturno del soggetto rispetto a SDNN mediata sullo stesso periodo (d). Oltre al particolato, le variabili indipendenti incluse nei modelli sono: temperatura, umidità relativa, genere, gruppo, età, Body-Mass-Index, hs-PCR, betabloccanti, diuretici, ACE-inibitori e calcio antagonisti, abitudine all'alcol. I soggetti sono stati considerati come effetti random del modello.**

Anche nel caso della SDNN, i risultati dei modelli lineari misti per misure ripetute mostrano un effetto legato alla concentrazione numerica delle particelle con diametro aerodinamico compreso tra 0.3 e 1  $\mu\text{m}$ . In particolare, il valore di SDNN mediato sulle ore di riposo notturno risulta associato in modo statisticamente significativo alle concentrazioni numeriche mediate sia sul periodo diurno che sul periodo notturno. In entrambi gli scenari, il tipo di associazione è negativo, pertanto un incremento delle concentrazioni di particolato determina una diminuzione della deviazione standard dell'intervallo tra due curve normali N-N dell'andamento delle pulsazioni cardiache.

### **3.4.2 Analisi dei dati continui**

Lo studio dei dati in continuo dei parametri cardiologici selezionati (FC e SDNN) si è basato sui risultati dei modelli lineari misti per misure ripetute applicati ai valori mediati sulle 24 ore del monitoraggio, sulle ore di veglia e sulle ore di riposo notturno dei soggetti. In particolare, ricordiamo che si è evidenziata un'associazione statisticamente significativa per entrambi i parametri cardiologici nel caso delle frazioni di particolato con diametro aerodinamico compreso tra 0.3 e 1  $\mu\text{m}$ ; l'analisi dei dati in continuo è stata focalizzata quindi sullo studio di queste frazioni.

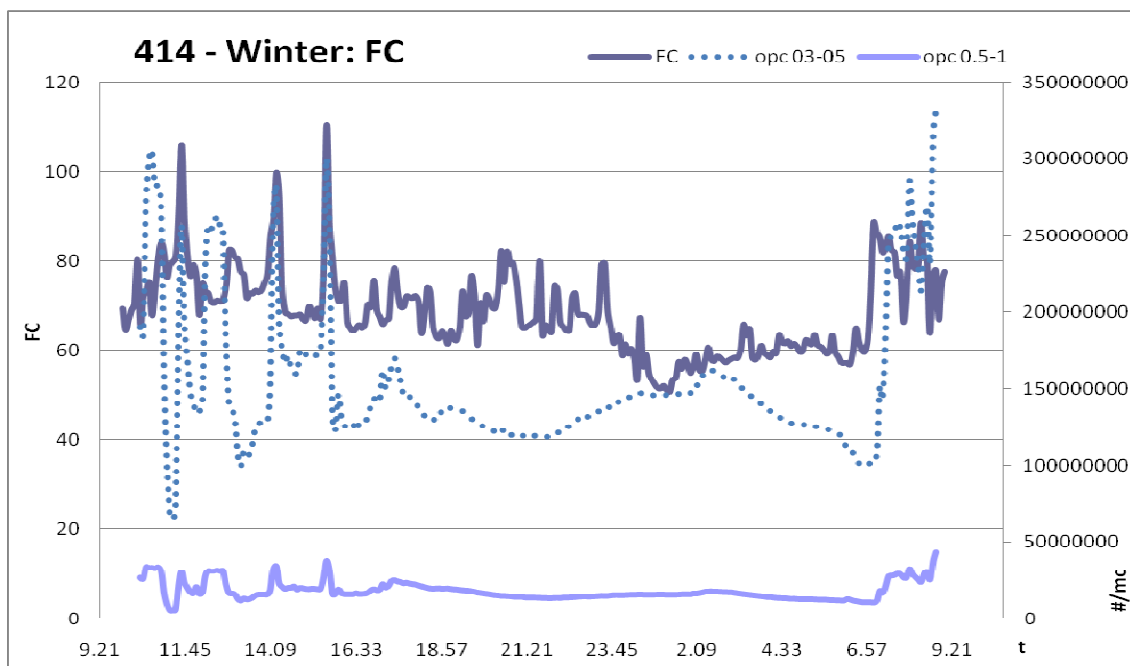
Il gruppo di soggetti, individuati per indagare il tempo di latenza tra esposizione a particolato ed effetto clinico, è stato quello dei cosiddetti "sani", in quanto maggiormente uniforme a livello di patologie e di farmacoterapia.

I casi in cui sono stati disponibili sia i tracciati dell'ECG-Holter che i valori continui delle misure di particolato sono stati 53, di cui 29 per il monitoraggio estivo e 25 per quello invernale.

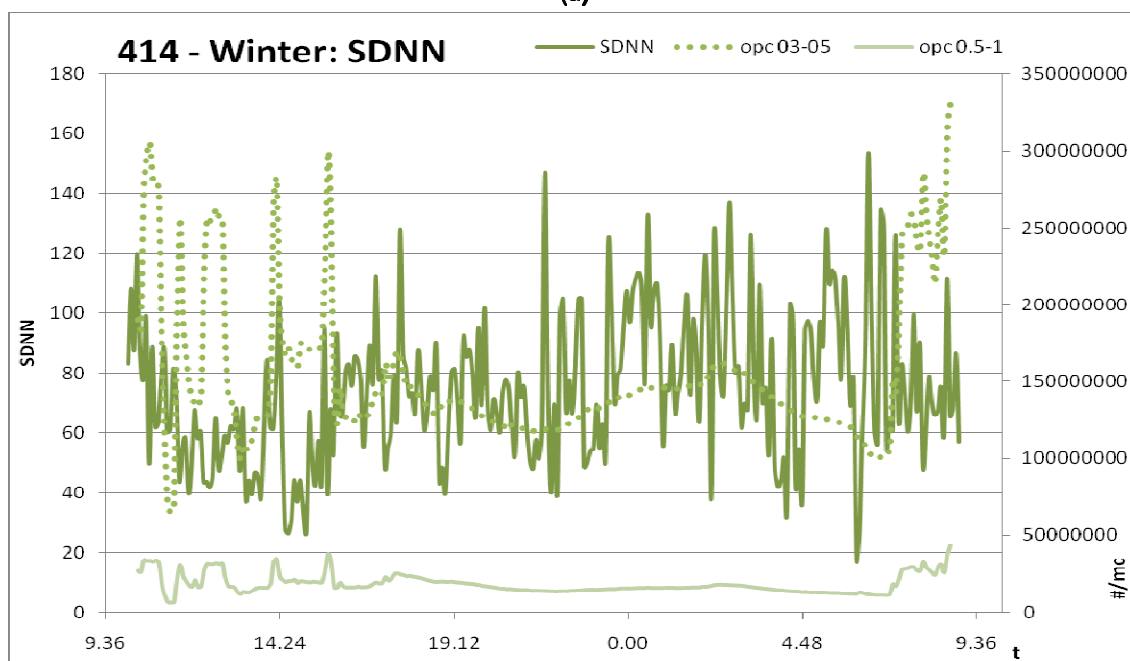
#### ***3.4.2.1 Approccio grafico***

Un esempio del confronto grafico, rispetto all'asse del tempo, fra le curve continue di particolato fine e i due parametri cardiologici in studio sono riportati in figura 3.5(a-b).





(a)



(b)

**Fig. 3.5 (a-b) Esempio di un confronto grafico delle concentrazioni numeriche di particolato fine ( $PM_{0,3-0,5}$  e  $PM_{0,5-1}$ ) e dei parametri cardiologici selezionati (FC (a) e SDNN (b)) di un soggetto appartenente al gruppo "Sani".**

Per quanto riguarda la frequenza cardiaca, in alcuni casi l'approccio grafico ha suggerito la presenza di un tempo di latenza piuttosto breve, dell'ordine dei minuti, come mostrato in fig. 3.5(a), in cui è riportato uno dei casi più significativi. L'approccio grafico si è rivelato invece inadatto allo studio della SDNN, in quanto la tipologia di dato è risultata troppo variabile nell'intervallo di tempo scelto (fig. 3.5 (b)).

### 3.4.2.2 Studio della correlazione

Il passo successivo è stato lo studio della correlazione lineare tra i livelli di particolato e i valori di frequenza cardiaca e di SDNN.

Sono state verificate correlazioni con diversi shifts temporali rispetto all'inizio del monitoraggio.

Considerato che, per la frequenza cardiaca, i risultati dei modelli lineari misti per misure ripetute hanno mostrato un'associazione statisticamente significativa tra l'esposizione e il parametro mediato sia sulle 24 ore che sulle ore di veglia dei soggetti, sono stati testati gli shifts temporali dalla 1<sup>a</sup> alla 12<sup>ma</sup> ora. Inoltre, in virtù di quanto suggerito dal confronto grafico, si è scelto di suddividere ulteriormente la prima ora di shift tra esposizione e FC in 5' e 30'.

Per quanto riguarda la SDNN, i modelli lineari misti per misure ripetute hanno mostrato un'associazione statisticamente significativa tra il parametro, mediato sulle ore di riposo notturno, e l'esposizione sia mediata sulle ore di veglia che mediata sulle ore notturne. Pertanto gli shift temporali studiati sono andati dalla 13<sup>ma</sup> ora alla 22<sup>ma</sup> del monitoraggio.

Si è andata a indagare, quindi, la presenza di intervalli temporali che più frequentemente mostrassero un coefficiente di correlazione (o di Pearson) in valore assoluto maggiore di 0,5. La tabella 3.7(a-b) riporta le frequenze percentuali per la frequenza cardiaca.

$r > 0.5$	5'	30'	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	10h	11h	12h
0.3-0.5 $\mu\text{m}$	<u>13.2</u>	9.4	5.7	7.5	5.7	9.4	<u>13.2</u>	<u>15.1</u>	<u>13.2</u>	<u>11.3</u>	5.7	9.4	<u>13.2</u>
0.5-1 $\mu\text{m}$	<u>13.2</u>	9.4	5.7	3.8	7.5	9.4	9.4	<u>13.2</u>	<u>11.3</u>	<u>13.2</u>	7.5	<u>11.3</u>	<u>11.3</u>

(a)

$r < -0.5$	5'	30'	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	10h	11h	12h
0.3-0.5 $\mu\text{m}$	7.5	9.4	<u>11.3</u>	7.5	1.9	3.8	3.8	1.9	0.0	1.9	7.5	5.7	3.8
0.5-1 $\mu\text{m}$	5.7	7.5	9.4	7.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.8	3.8	0.0

(b)

Tab. 3.7(a-b) Percentuali di casi con coefficiente di correlazione  $r$  maggiore di 0,5 (correlazione positiva) (a), e con coefficiente di correlazione  $r$  minore di -0,5 (correlazione negativa) per lo studio dell'associazione tra frequenza cardiaca e  $\text{PM}_{0.3-0.5}$   $\text{PM}_{0.5-1}$  per diversi lag temporali.

Per la frequenza cardiaca, la percentuale di casi con  $r > 0.5$  (associazione positiva) (tab. 3.7(a)) supera il 10% dopo i primi 5', quindi nell'intervallo 6-8h, infine dopo 12h dall'inizio dell'acquisizione dei dati, mentre, per  $r < -0.5$  (associazione negativa), il 10% viene superato per uno shift di 1h per la sola frazione PM<sub>0.3-0.5</sub> (tab. 3.7(b)).

Nel caso della SDNN le correlazioni effettuate risultano tutte con una  $r$  di Pearson inferiore allo 0,2 in valore assoluto.

### **3.4.3 Discussione dei risultati per gli indicatori della variabilità della frequenza cardiaca**

La frazione di particolato che è risultata associata ad un effetto sui parametri cardiologici di interesse è quella con diametro aerodinamico compreso tra 0.3 e 1  $\mu\text{m}$ .

Ciò indica che le sorgenti più importanti sono in questo caso di tipo sia indoor che outdoor e apparterebbero alla moda di accumulazione. In base a questo risultato, l'esposizione invernale è quella potenzialmente più nociva, considerato che in essa si è misurato un netto incremento dei livelli di particelle di questa frazione granulometrica.

Sarebbero, quindi, le particelle appartenenti alla frazione fine le principali responsabili degli effetti nocivi del particolato sul cuore. Infatti, da una parte, l'aumento della frequenza cardiaca, in associazione all'esposizione a particolato urbano, è sintomatica di una diminuzione del controllo del sistema nervoso autonomo sul ritmo cardiaco; dall'altra, la diminuzione della deviazione standard dell'intervallo temporale tra due battiti normali N-N del cuore implica una diminuzione complessiva della variabilità della frequenza cardiaca, e quindi una diminuzione della capacità di adattamento della bilancia simpato-vagale, che ne regola la funzionalità. Tale risultato è una conferma delle evidenze scientifiche riportate in letteratura, che hanno individuato un effetto nocivo a carico del sistema cardiorespiratorio, con conseguenze patologiche che possono condurre fino alla morte improvvisa.

Inoltre il fatto che non sia stata verificata alcuna associazione con le particelle appartenenti al range ultrafine ( $0.02 < d_a < 1\mu\text{m}$ ) indicherebbe che l'azione del particolato sul sistema nervoso autonomo non sia dovuta al passaggio diretto delle particelle in circolo, come ipotizzato nell'importante studio di Nemmar del 2002, ma che sia piuttosto dovuto ad altri meccanismi, o mediati dall'infiammazione/ossidazione locale a livello polmonare, o dovuti ad un'azione diretta delle particelle sulle terminazioni nervose delle fibre afferenti polmonari.

Lo studio della correlazione tra le curve di esposizione a particolato fine e i tracciati dell'elettrocardiogramma secondo Holter, spostati di diversi shifts temporali, hanno evidenziato, per la frequenza cardiaca, la forte predominanza di un'associazione positiva. Ciò confermerebbe quanto ottenuto con l'applicazione dei modelli misti alle misure mediate sulle 24h.

I risultati suggeriscono sia un effetto dell'esposizione di tipo immediato (o very short term), come già riscontrato da altri studi che hanno identificato tempi di latenza dell'ordine dei 5-30 minuti (*Adar* 2007, *Wu* 2010); sia una risposta più lenta, con un tempo di latenza dell'ordine delle 6-8 ore, che è stato ritrovato negli studi di altri gruppi di ricerca (*Cavallari* 2007, *Magari* 2001).

Nel caso della SDNN, il risultato che la correlazione con le curve di esposizione risulti di valore trascurabile potrebbe ragionevolmente non essere indice di una effettiva mancanza di associazione, ma conseguenza di un approccio statistico non adatto alla tipologia del dato. Per ovviare a questa problematica sarebbe necessaria l'applicazione di tecniche statistiche più approfondite. Considerate le finalità descrittive e preliminari relative all'esame dei dati in continuo del progetto PM-CARE nel contesto del presente dottorato, si è deciso di non approfondire lo studio di questo parametro.

In generale l'approccio statistico utilizzato per l'analisi dei dati in continuo del progetto PM-CARE è stato mirato solo a un'analisi descrittiva e le correlazioni non hanno tenuto conto di variabili confondenti e di modificatori dell'effetto in studio.

## ***CAPITOLO 4***

# **Conclusioni**

Il presente progetto di dottorato si inserisce nell'ambito di un progetto di ricerca di rilevanza nazionale, cofinanziato dal Ministero dell'Istruzione e della Ricerca Scientifica: il progetto PM-CARE, ("Particulate Matter: CArdiovascular and Respiratory Effects"). Lo studio ha l'obiettivo di indagare gli effetti del particolato atmosferico sulla salute dell'uomo, tema di sempre maggior interesse per la salute pubblica, a causa degli ormai noti effetti nocivi a carico del sistema cardio-respiratorio. Di tali effetti, obiettivo dello studio è stata la comprensione dei meccanismi fisiopatologici, argomento ancora dibattuto nell'ambito della comunità scientifica internazionale.

Il progetto PM-CARE si è sviluppato attraverso lo studio di 81 soggetti, suddivisi in cardiopatici, pneumopatici e "sani", cioè non cardiopatici-non pneumopatici. Il monitoraggio, della durata di 24 ore, è stato eseguito due volte, una durante l'inverno e una durante l'estate, nell'ipotesi di diversi scenari espositivi. Sono state effettuate misure di particolato di diverse frazioni dimensionali, di tipo sia gravimetrico (dati discreti) che numerico (dati continui). Dal punto di vista clinico sono stati effettuati monitoraggi di tipo ematochimico, cardiologico e pneumologico.

I parametri clinici selezionati nel presente progetto di dottorato sono stati: la proteina C-reattiva, come indice di infiammazione sistemica (hs-PCR), il fibrinogeno, come indice dello stato coagulatorio sanguigno, la frequenza cardiaca e la deviazione standard dell'intervallo temporale tra due battiti normali N-N, come indici della variabilità del ritmo cardiaco (FC e SDNN).

Dopo una prima analisi descrittiva, l'associazione tra esposizione ed effetto clinico è stata verificata mediante l'applicazione dei modelli lineari misti per misure ripetute.

Infine, sono stati valutati, con un'analisi preliminare, i tempi di latenza tra esposizione ed effetto clinico, per i parametri cardiologici continui.

I livelli di particolato sono risultati nel complesso superiori ai livelli raccomandati dalle linee guida della WHO in entrambi i monitoraggi per il PM<sub>2.5</sub>, e nel monitoraggio invernale per il PM<sub>10</sub>, costituito prevalentemente da particelle con  $d_a < 0.5 \mu\text{m}$  (67%) (moda di accumulazione).

Il trend stagionale (concentrazioni maggiori in inverno), è stata determinato dalla classe di particelle con diametro aerodinamico compreso tra 0.3 e 1  $\mu\text{m}$ , probabilmente a causa delle emissioni dei riscaldamenti domestici. I livelli delle particelle sia ultrafini che grossolane, invece, sono rimasti praticamente invariate, in quanto le loro sorgenti non sono associate a fattori climatici.

Lo studio dell'associazione a particolato per la proteina C-reattiva e per il fibrinogeno hanno mostrato che esiste un effetto statisticamente significativo dovuto alla concentrazione numerica della frazione grossolana di particolato (5÷10  $\mu\text{m}$ ). Le sorgenti sarebbero quindi di tipo prevalentemente outdoor, e la causa dell'effetto nocivo potrebbe essere riconducibile alla presenza, caratteristica di questa frazione, di endotossine batteriche, pollini e spore, con la cui esposizione attiverebbe o accentuerebbe lo stato di infiammazione sistemica e di processi coagulatori. Inoltre, l'effetto sembrerebbe più marcato in associazione all'esposizione notturna, suggerendo un tempo di latenza tra esposizione ed effetto piuttosto breve. Infine, le caratteristiche cliniche associate ai tre gruppi in studio non sono risultate significative in termini di suscettibilità al particolato.

Gli indicatori della variabilità cardiaca sono risultati influenzati dalla concentrazione numerica di particelle con diametro aerodinamico compreso tra 0.3 e 1  $\mu\text{m}$ , ovvero dalla componente fine del particolato atmosferico. Questa frazione di particelle è legata a sorgenti sia indoor che outdoor e, considerato che la sua concentrazione è risultata particolarmente elevata nel periodo invernale, l'esposizione della stagione fredda risulterebbe potenzialmente più nociva. La suscettibilità diversa tra i gruppi di soggetti è risultata omogenea.

L'incremento della frequenza cardiaca con le concentrazioni di particolato è traducibile, a livello clinico, in una diminuzione del controllo del sistema nervoso

autonomo sulla regolazione del ritmo cardiaco (l'associazione è stata riscontrata tra le misure mediate sulle 24 ore e sul periodo di veglia dei soggetti).

La diminuzione della deviazione standard dell'intervallo temporale tra due battiti normali N-N (SDNN), corrispondente a un incremento di PM, è indice di una riduzione della funzionalità della bilancia simpato-vagale e quindi della variabilità del ritmo cardiaco (l'associazione è risultata statisticamente significativa per la media del parametro nel periodo di riposo notturno dei soggetti, in associazione all'esposizione sia del periodo diurno che del periodo notturno).

I risultati ottenuti sono coerenti con le ipotesi di meccanismi patogenetici di tipo infiammatorio/ossidativo a livello del polmone, o legati ad un'azione diretta delle particelle sulle terminazioni nervose delle fibre afferenti polmonari, ma escluderebbero il passaggio diretto nella circolazione sanguigna delle particelle ultrafini, data la mancanza di un'associazione significativa con questa frazione.

Infine, lo studio dei dati in continuo, finalizzato all'identificazione del tempo di latenza tra esposizione ed effetto, è stato sviluppato sul gruppo dei "sani", per ragioni di maggior omogeneità del campione, e sulla frazione risultata associata dallo studio dei dati mediati ( $0.3 \div 1 \mu\text{m}$ ). Per la frequenza cardiaca, i risultati suggeriscono che l'effetto dell'esposizione a particolato sia immediato (dell'ordine dei 5'-30') e ritardato di 6-8 ore. I risultati, sebbene preliminari, trovano riscontro in quelli di altri gruppi di ricerca.

Per quanto riguarda il parametro SDNN, invece, il tipo di approccio statistico si è rivelato inadeguato alla tipologia di parametro, e la mancanza di correlazione con la curva ambientale è verosimilmente riconducibile alla necessità di uno studio statistico più complesso.

Gli sviluppi futuri saranno quindi indirizzati all'approfondimento dei dati in continuo con un approccio statistico più raffinato (applicazione di modelli misti su moving averages a diversi intervalli temporali, utilizzo di smoothing functions) e all'estensione delle analisi al data set completo del progetto PM-CARE.

Da un punto di vista prettamente ambientale, invece, gli obiettivi successivi saranno mirati all'analisi delle concentrazioni di particolato in funzione di fattori determinanti, quali le attività dei soggetti durante il monitoraggio, le caratteristiche principali delle loro unità abitative e i livelli outdoor registrate dalla centraline ARPA più vicine.

# Bibliografia di riferimento

- Abou Chakra OR et al. 2007, *Genotoxicity of organic extracts of urban airborne particulate matter: an assessment within a personal exposure study*, Chemosphere; 66 : 1357-1381
- Abt E et al. 2000, *Relative Contribution of Outdoor and Indoor Particle Sources to Indoor Concentrations*, Environmental Science and Technology; 34: 3579-3587
- Adar SD et al. 2007, *Focused exposure to airborne traffic particles and heart rate variability in the elderly*; Epidemiology; 18: 95-103
- Adgate J. L. et al., 2003, *Longitudinal variability in outdoor, indoor and personal PM<sub>2.5</sub> exposure in healthy non-smoking adults*, Atmospheric Environment; 37(7): 993-1002
- Araujo J.A. et al. 2008, *Ambient particulate pollutants in the ultrafine range promote early atherosclerosis and systemic oxidative stress*, Circ Res.;102:589-596
- Baccarelli A. et al. 2008, *Cardiac autonomic dysfunction : effects from particulate air pollution and protection by dietary methyl nutrients and metabolic polymorphisms*, Circulation;117:1802-1809b
- Bai et al. 2007, *The pharmacology of particulate matter air pollution- cardiovascular dysfunction* Pharmacology & Therapeutics; 113: 16–29
- Becker S., et al. 2003, *Response of human alveolar macrophages to ultrafine, fine, and coarse urban air pollution particles*, Experimental Lung Research 29(1):29-44.
- Berend I. T. 2006, *An Economic History of Twentieth-Century Europe*, Cambridge University Press
- Brook D.B. et al. 2004, *Air pollution and cardiovascular disease : a statement for healthcare professionals from the expert panel on population and prevention science of the American Heart Association*, Circulation;109:2655-2671
- Carlsten et al. 2007, *Coagulation markers in healthy human subjects exposed to diesel exhaust*, Thrombosis Research; 120, 849–855
- Brown DM et al. 2004, *Effects of PM<sub>10</sub> in human peripheral blood monocytes and J774 macrophages*. Respiratory Research; 5:29.
- Cattaneo A. Et al. 2010, *Comparison between personal and individual exposure to urban air pollutants*, Aerosol Science and Technology, 44:5, 370-379



- Cavallari JM et al. 2007 *Night heart rate variability and particulate exposures among boilermaker construction workers*. Environ Health Perspect; 115: 1046-1051
- Chan C.C. et al., 2004, *Personal exposure to submicrometer particles and heart rate variability in human subjects*, Environ Health Perspect; 112(10) : 1063-7
- Chuang KJ. et al. 2005, *Effects of particle size fractions on reducing heart rate variability in cardiac and hypertensive patients*, Environ Health Perspect; 113(12):1693-7
- Cohen, A.J. and C.A. Pope, 3rd, 1995, *Lung cancer and air pollution*, Environ Health Perspect; 103 Suppl 8: 219-24.
- Delfino R.J. et al. 2004, *Association of FEV<sub>1</sub> in asthmatic children with personal and microenvironmental exposure to airborne particulate matter*, Environ Health Perspect ; 112:932–941
- Dockery DW. et al. 1993, *An association between air pollution and mortality in six U.S. cities* ; N Engl J Med.; 329(24):1753-9
- Dockery DW 2001, *Epidemiologic evidence of cardiovascular effects of particulate air pollution* 109 (suppl 4): 483-486
- Fujii T. et al. 2001, *Particulate matter induces cytokine expression in human bronchial epithelial cells*, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 25: 265-271.
- Gold D. et al. 2000, *Ambient pollution and heart rate variability*, Circulation; 101:1267-1273.
- Goldberg MS et al 2001, *Identification of persons with cardiorespiratory conditions who are at risk of dying from the acute effects of ambient air particles*, Environ Health Perspect, 109 Suppl 4 : 487-94
- Hindts W.C. Aerosol Technology 1999, 2<sup>nd</sup> ed. New York : John Wiley and Sons
- Garramone G. 2007, *Valutazione dell'esposizione individuale al particolato urbano ed agli inquinanti gassosi ad esso correlati nell'ambito del progetto PM-CARE*, tesi di dottorato di ricerca, Università degli Studi dell'Insubria
- Garson D <http://www2.chass.ncsu.edu/garson/pa765/multilevel.htm>
- Ghio et al. 2003. *Exposure to concentrated ambient air particles alters hematologic indices in humans*. Inhal Toxicol 15, 1465–1478.
- Ghio A.J. et al. (2000a), *Concentrated ambient air particles induce mild pulmonary inflammation in healthy human volunteers*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 162: 981-998.
- Ghio A.J. et al. (2000b), *Concentrated ambient air particles induce neutrophilic lung inflammation in healthy volunteers* Am. J. Respir. Crit. Care Med. 162: 901-908.

- Gilmour et al. 2005. *The procoagulant potential of environmental particles (PM10)*, Occup Environ Med 62, 164–171.
- Gonzalez-Flecha B. (2004) *Oxidant mechanisms in response to ambient air particles*, Molecular Aspects of Medicine. 25 :169–182.
- Harrison RM et al. *Personal exposure monitoring of particulate matter, nitrogen dioxide, and carbon monoxide, including susceptible groups*, Occupational and Environmental Medicine; 59(10): 671-679
- Hext, P.M., 1994, *Current perspectives on particulate induced pulmonary tumours*. Hum Exp Toxicol,. 13(10): p. 700-15.
- Hoek, G., et al. 2001, *The association between air pollution and heart failure, arrhythmia, embolism, thrombosis, and other cardiovascular causes of death in a time series study*, Epidemiology; 12(3): 355-7.17
- Jantunen M et al. 1998, *Air pollution in European cities: the EXPOLIS study*, J Exposure Anal Environ Epidemiol; 8: 495-518
- Jiang J. Linear and Generalized Linear Mixed Models and Their Applications - Springer Series in Statistics 2007
- Katsouyanni K. et al. 2001, *Confounding and effect modification in the short-term effects of ambient particles on total mortality : results from 29 European cities within the APHEA2 project*, Epidemiology;12(5):521-531
- Kim D et al 2006, *Association between personal exposure and fixed-site ambient measurements of fine particulate matter, nitrogen dioxide and carbon monoxide in Toronto, Canada*, Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology ; 16[2] :172-183
- Kousa A et al. 2001, *Personal exposures to NO2 in the EXPOLIS-study: relation to residential indoor, outdoor and workplace concentrations in Basel, Helsinki and Prague*, Atmospheric Environment; 35: 3405–3412
- Kreyling W. et al., 2003 *Diverging long-term trends in ambient urban particle mass and number concentrations associated with emission changes caused by the German unification*. Atmospheric Environment; 37(27):3841-3848
- Kwon, H.J. et al. 2001, *Effects of ambient air pollution on daily mortality in a cohort of patients with congestive heart failure*, Epidemiology; 12(4): 413-9.
- Laden F., et al. 2000, *Association of fine particulate matter from different sources with daily mortality in six U.S. cities*, Environ Health Perspect; 108(10): 941-7
- Lipsett MJ et al. 2006, *Coarse particles and heart rate variability among older adults with coronary artery disease in the Coachella Valley, California*, Environmental Medicine; 63(10): 700-706

- Liu L et al. 1995, *Assessment of ozone exposures in the greater metropolitan Toronto area*, J Air Waste Manage Assoc; 45:223–34
- Liu L et al. 2007, *Influence of personal exposure to particulate air pollution on cardiovascular physiology and biomarkers of inflammation and oxidative stress in subjects with diabetes*, Journal of Occupational and Environmental Medicine; 49: 258-265
- Magari S.R. et al., 2001 *Association of heart rate variability with occupational and environmental exposure to particulate air pollution*. Circulation; 104:986-991
- Mosqueron L et al. 2002, *Personal exposure of Paris office workers to nitrogen dioxide and fine particles*, Occupational and Environmental Medicine;(59):550-555
- Misra C, et al. 2002, *Development and Evaluation of a Personal Cascade Impactor Sampler (PCIS)*, Journal of Aerosol Science; 33 : 1027-1047
- Nemmar A et al. 2002 *Passage of inhaled particles into the blood circulation on humans*. Circulation; 105:411-414
- Nemmar et al. 2003. *Size effect of intratracheally instilled particles on pulmonary inflammation and vascular thrombosis*. Toxicol Appl Pharmacol 186, 38–45.
- Nerriere E et al. 2005, *Can we use fixed ambient air monitors to estimate population long-term exposure to air pollutants ? The case of spatial variability in the Genotx ER study*. Environmental Research ; 97[1], 32-42
- Nerriere E et al. 2007, *Spatial heterogeneity of personal exposure to airborne metals in French urban areas*, Science of the Total Environment ; (373) : 49-56
- Peters A et al. 1997 *Increased plasma viscosity during the 1985 air pollution episode: a link to mortality?* Lancet; 349:1582-1587
- Poloniecki, J.D., et al., *Daily time series for cardiovascular hospital admissions and previous day's air pollution in London, UK*. Occup Environ Med, 1997. 54(8): p. 535-40
- Pope C.A., et al. 1999, *Heart rate variability associated with particulate air pollution*, Am. Heart J.;138: 90-99.
- Pope CA 3rd et al. 2004a *Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease*. Circulation 109: 71-77
- Rossi, G. et al. 1999, *Air pollution and cause-specific mortality in Milan, Italy, 1980-1989*, Arch Environ Health,. 54(3): 158-64
- Rohr AC 2003, *Generation and quantification of ultra-fine particles through terpene/ozone reaction in a chamber setting*, Aerosol Sci. Technol;37(1) 65-78
- Ruckerl. et al. 2007, *Ultrafine particles and platelet activation in patients with*

*coronary heart disease – results from a prospective panel study.* Particle and Fibre Toxicology, 4:1

- Salvi S et al. 1999, *Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers*, AmJ Respir Crit Care med; 159(3):702-9

- Samet JM et al. 2000, *Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987-1994*, N Engl J Med; 343(24): 1742-9

- Sarnat JA et al. 2005, *Ambient gas concentrations and personal particulate matter exposures: implications for studying the health effects of particles*, Epidemiology; 16(3): 385-395

- Sarnat SE et al. 2006, *Factors affecting the association between ambient concentrations and personal exposures to particles and gases*, Environ Health Perspect; 114(5), 649-654

- Sarnat SE et al. 2006, *Ambient particulate air pollution and cardiac arrhythmia in a panel of older adults in Steubenville, Ohio*, Occupational and environmental Medicine; 63(10): 700-706

- See SW and Balasubramanian R 2006, *Risk assessment of exposure to indoor aerosols associated with Chinese cooking*; 102(2): 197-204

- Schwartz J et al. 1996, *Is daily mortality associated specifically with fine particles?* J Air Waste Manag Assoc; 46 : 927-939

- Schwartz J et al. 1997, *Air pollution and hospital admissions for cardiovascular disease in Tucson*, Epidemiology; 8(4):371-7

- Schwartz J et al. 1994, *PM10, ozone, and hospital admissions for the elderly in Minneapolis-St. Paul, Minnesota*, Arch Environ Health ; 49(5) : 366-74

- Suwa T. et al. 2002, *Ambient air particulates stimulate alveolar macrophages of smokers to promote differentiation of myeloid precursor cells*. Exp. Lung Res. 28:1-18.

- Vallejo M et al. 2006, *Ambient fine particles modify heart rate variability in young healthy adults*, Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology; 16: 125-130

- van Eeden S.F. et al. 2001, *Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM10)*, Am. J. Respir. Critic. Care Med. 164:826-830.

- Whittby K.T. 1978, *The physical characteristics of sulphur aerosols* Atmos. Environ.; 12:135-159

- WHO 2006, *WHO Air Quality Guidelines: global update 2005*. World Health Organization Regional Office for Europe
- Wichmann, H.E., et al., *Daily mortality and fine and ultrafine particles in erfurt, germany part I: role of particle number and particle mass*. Res Rep Health Eff Inst, 2000(98): p. 5-86; discussion 87-94. 16
- Woodruff, T.J. et al.1997, *The relationship between selected causes of postneonatal infant mortality and particulate air pollution in the United States*. Environ Health Perspect; 105(6): 608-12
- Wu S et al. 2010, *Association of heart rate variability in taxi drivers with marked changes in particulate air pollution in Beijing in 2008*; Environm Health Perspect; 118.1: 87-91
- Yeatts K et al. 2007, *Coarse particulate matter (PM<sub>2.5-10</sub>) affects heart rate variability, blood lipids and circulating eosinophils in adults and asthma*, environmental Health Perspectives; 115(5): 709-714
- Zanobetti A et al. 2004, *Ambient pollution and blood pressure in cardiac rehabilitation patients*, Cirulation; 110(15): 2184-9

## **Pubblicazioni prodotte**

- L. Ruggeri, P. Urso, A. Cattaneo, S. Fossati, A.C. Fanetti, E. Corsini, S. Fustinoni, D. Cavallo, P. Carrer (2010) Lo studio PM-CARE. Effetti dell'esposizione a particolato atmosferico urbano su parametri infiammatori in soggetti suscettibili e sani. In: Book of abstract SIMLII Congresso 2010
- A.C. Fanetti, P. Urso, A. Cattaneo, S. Fossati, L. Ruggeri, D. M. Cavallo, P. Carrer (2010) Progetto PM CARE - Diminuzione della funzionalità respiratoria in soggetti esposti ad aumentati livelli di particolato urbano. In: Book of abstract SIMLII Congresso 2010
- S. Fossati, P. Urso, A. Cattaneo, A.C. Fanetti, L. Ruggeri, A. Pini, G. De Vito, D. Cavallo, P. Carrer (2010) Ruolo del particolato fine e ultrafine nei meccanismi patogenetici degli effetti cardiovascolari prodotti dall'inquinamento urbano: risultati dal Progetto PM-CARE. In: Book of abstract SIMLII Congresso 2010
- Fossati S., Urso P., Ruggeri L., Fanetti A.C., Metruccio F., Peruzzo C., Pini A., Cavallo D., Carrer P (2009). Effects of urban air particulate matter on autonomic control of heart rhythm, arrhythmia predisposition and arterial blood pressure in adult subjects with different health conditions. Journal of Physics Conference Series J. Phys.: Conf. Ser. 151(011002):56.
- L Ruggeri, Urso P., Cattaneo A., Garramone G., Fossati S., Fanetti AC., Metruccio, C. Corsini E, Fustinoni S., Marinovich M., Cavallo D., Schlitt C., Carrer P. Inflammatory Effects Of Fine and Ultrafine Urban Air Particulate Matter Exposure in Adult Subjects With Different Health Conditions. In: Book of abstracts INIS 2008. vol. 1:99.
- Fossati S., Urso P., Ruggeri L., Fanetti A.C., Metruccio F., Peruzzo C., Pini A., Cavallo D., Carrer P (2008). Effects of urban air particulate matter on autonomic control of heart rhythm, arrhythmia predisposition and arterial blood pressure in adult subjects with different health conditions. In proceedings of "Inhaled Particles X" Sheffield – UK, 2008, vol. 1:9a4.
- AC Fanetti, E Corsini, G De Vito, S Fossati, S Fustinoni, F Metruccio, A Pini, L Ruggeri, P Urso, P Carrer (2008). The PM-CARE project: Particulate Matter CArdio-Respiratory Effects. In proceedings of "Indoor Air Conference 2008" Copenhagen – Denmark, 2008, vol. 1.

## RINGRAZIAMENTI

Ringrazio, prima di tutto, il mio tutor, Professor Domenico Cavallo, e il mio co-tutor, Professor Paolo Carrer, per la loro preziosa supervisione.

Lo sviluppo del mio progetto di dottorato non sarebbe però stato possibile senza la stretta collaborazione e il paziente lavoro del team ambientale del progetto di ricerca PM-CARE, tra cui è doveroso menzionare i dottori Andrea Cattaneo e Gaetano Garramone, punti di riferimento nel mio vagabondare fra le diverse frazioni di particolato.

Parallelamente, il team clinico del progetto PM-CARE è stato fondamentale non solo nello sviluppo dello studio, ma anche per le interminabili e agguerrite chiacchierate sui risultati del progetto, a cui ha posto fine, come un deus ex machina, il dottor Giovanni Casazza, quale supervisore statistico. Del team clinico, dicevo, ringrazio in modo particolare la dottoressa Laura Ruggeri, carissima amica e fidata collega, e la dottoressa Serena Fossati, per ora a Boston a seguire il sogno del progetto PM-CARE sui dati in continuo, a cui auguro di trovare la strada verso un'inconfutabile significatività...

Ringrazio ovviamente, la mia famiglia, per il sostegno, e in particolare mio padre, per la supervisione della tesi e per il suo inossidabile entusiasmo (non solo) scientifico.

Ringrazio, poi, Christian, per l'incoraggiamento e la pazienza, e per le ottime cene preparate durante la stesura della tesi.

Infine, il più difficile dei ringraziamenti va al Professor Marco Maroni, la cui presenza ci è stata sottratta in modo improvviso quanto doloroso, qualche anno fa. Giusto in tempo per dare vita a questo progetto e al gruppo di ricerca che lo ha portato avanti.

Di lui vorrei ricordare la scintilla geniale dei suoi ragionamenti, l'ambizione, l'entusiasmo e la fiducia comunicata ai suoi collaboratori. Ma le parole impoveriscono i pensieri, in realtà.

*Banalmente, dedico a lui questa mia tesi di dottorato.*